

Université de Sherbrooke

**CONCEPTION, SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET OPTIMISATION
D'ANALOGUES MACROCYCLIQUES DE LA NEUROTENSINE (8-13)**

Par
Marc Sousbie
Programme de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2018

Membres du jury d'évaluation
Pr Éric Marsault, PhD.
Programme de Pharmacologie, Directeur de recherche
Pr Richard Leduc, PhD.
Programme de Pharmacologie, Directeur de Recherche
Pr Brigitte Guérin, PhD.
Programme de Médecine Nucléaire, Évaluatrice externe au programme
Pr David Chatenet, PhD.
INRS-Institut Armand-Frappier, Évaluateur externe à l'Université
Pr Guylain Boulay, PhD.
Programme de Pharmacologie, Directeur du programme

©Marc Sousbie, 2018

À Lucas.

*I am only one, but I am one. I cannot do everything, but I can do something. And because
I cannot do everything, I will not refuse to do the something that I can do.*

-Edward Everett Hale

You don't have to be crazy to do this, but it helps.

-Bob Ross

RÉSUMÉ

CONCEPTION, SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET OPTIMISATION D'ANALOGUES MACROCYCLIQUES DE LA NEUROTENSINE (8-13)

Par
Marc Sousbie
Programme de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La neurotensine est un neuropeptide. C'est le ligand endogène de deux membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs NTS1 et NTS2. L'activation de ces récepteurs par ce ligand est connue pour provoquer un puissant effet analgésique. Le système neurotensinergique est donc une cible de choix pour le développement de composés analgésiques. Afin d'explorer et faire avancer les connaissances de relations structure-activité entre la neurotensine et ses récepteurs, nous avons utilisé une approche de conception rationnelle d'analogues du ligand endogène. En nous basant sur les informations disponibles dans la littérature scientifique, nous avons macrocyclisé ce peptide afin de contraindre sa conformation. Nous avons aussi évalué l'effet de la macrocyclisation sur la stabilité des analogues ainsi produits.

La première étape, (chapitre 3), a consisté à trouver une manière de macrocycliser qui favorise la liaison au récepteur. Ceci a été facilité par la structure cristallographique du récepteur NTS1.

L'étape suivante (chapitre 4) a consisté à optimiser les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques du macrocycle obtenu, tant au niveau de la liaison/activation du récepteur qu'au niveau de la résistance aux protéases. Deux macrocycles ont ainsi été sélectionnés pour être caractérisés dans des essais *in vivo*, l'un avec la meilleure affinité et une stabilité modérée, l'autre avec une excellente stabilité mais une affinité modérée. Ceux-ci ont démontré leur capacité à induire un puissant effet analgésique dans deux modèles de douleur.

Enfin, le chapitre 5 décrit comment des macrocycles sélectifs envers NTS2 peuvent être obtenus dans le but de produire des composés présentant moins d'effets indésirables.

Mots-clés: Neurotensine, Peptide, RCPG, Macrocycle, RCM, Analgésie

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iv
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	ix
1 Introduction	1
1.1 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)	1
1.1.1 Importance pharmacologique et utilisations thérapeutiques des RCPG	1
1.1.2 Structure et classification	2
1.1.3 Signalisation	4
1.1.4 Interactions Ligand / Récepteur	6
1.2 Le système neurotensinergique	9
1.2.1 La neurotensine	9
1.2.2 Les récepteurs à la neurotensine	12
1.3 Relation Structure – Activité	17
1.3.1 Alanine scan	17
1.3.2 Analogues linéaires	18
1.3.3 Analogues macrocycliques	22
1.3.4 Antagonistes	25
1.3.5 Structure cristallographique du récepteur NTS1 de rat	26
1.3.6 Analogues sélectifs envers NTS2	28
1.4 Les macrocycles peptidiques en chimie médicinale	31
1.5 Problématique et hypothèse	34
2 Méthodes	35
2.1 La Cyclisation par Métathèse	35
2.2 Essais <i>in vitro</i>	36
2.2.1 Quantification de la liaison ligand / récepteur	36
2.2.2 Quantification de l'association/dissociation de protéines	37
2.3 Essais <i>in vivo</i>	39
2.3.1 Modèle de douleur aiguë	39
2.3.2 Modèle de douleur inflammatoire	39
2.3.3 Modélisation et amarrage moléculaire	40

3	Premier Article	42
3.1	References	52
3.2	Supplementary information	56
3.2.1	Additional figures	56
3.2.2	Chemistry	58
4	Deuxième article	65
4.1	Introduction	68
4.2	Results and discussion	71
4.3	Experimental Section	83
4.3.1	Peptide Synthesis	83
4.3.2	<i>In vitro</i> assays	88
4.3.3	In Vivo Analgesic Assays	90
4.4	References	93
5	Sélectivité envers NTS2	98
5.1	Introduction	98
5.2	Résultats	99
5.2.1	Affinité des macrocycles publiés sur NTS2	99
5.2.2	Composés non publiés	101
5.2.3	Conception de nouveaux composés	102
5.3	Conclusion	104
5.4	Matériel et Méthodes	105
5.4.1	Synthèse du Tryptophane <i>N</i> -allyle	105
5.4.2	Synthèse peptidique et essais biologiques	108
6	Discussion Générale	109
6.1	Discussion	109
6.2	Conclusion	110
7	Remerciements	112
8	Annexes	114
8.1	Annexe A : Information supplémentaire du 1 ^{er} article (Chapitre 3)	114
8.2	Annexe B : Information supplémentaire du 2 ^e article (Chapitre 4)	144
8.3	Annexe C : Caractérisation des composés du chapitre 5	178

LISTE DES FIGURES

1.1	Structure canonique d'un récepteur à sept domaines transmembranaires .	1
1.2	Médicaments ciblant les RCPG	2
1.3	Arbre phylogénétique représentant les RCPG.	3
1.4	Numérotation de Ballesteros-Weinstein	4
1.5	Mécanisme d'activation des protéines G par les RCPG	5
1.6	Voies de dégradation et recyclage des RCPG.	6
1.7	Différentes courbes d'activation pouvant être obtenues selon le type de ligand utilisé.	7
1.8	Deux ligands activant différemment le même récepteur	8
1.9	Profil signalétique d'un ligand biaisé	9
1.10	Séquence de la neurotensine.	9
1.11	Modèle d'inhibition de la douleur par la neurotensine (NT)	11
1.12	Maturation de la NT.	12
1.13	Récepteurs NTS1 et NTS2	12
1.14	Profil typique de l'évolution de la tension artérielle moyenne après injection de NT	13
1.15	Signalisation de NTS1	14
1.16	Expression des récepteurs à la NT	15
1.17	Structure domaine extracellulaire du récepteur NTS3	16
1.18	Structures 3D des analogues contraints de Bittermann <i>et al.</i> (2004)	18
1.19	Les analogues traversant la barrière hémato-encéphalique (BHE) NT69L et PD 149163	20
1.20	Analogues comportant un ou des résidus silylés	21
1.21	Macrocycles de Seffler <i>et al.</i> (1995)	22
1.22	Macrocycles tête-à-queue	23
1.23	Analogues macrocycliques chaîne latérale à queue par Lundquist et Dix (1999)	24
1.24	Antagonistes des récepteurs neurotensinergiques.	25
1.25	Structure par cristallographie du récepteur NTS1	26
1.26	Différence entre les sites de liaisons de hNTS1 et hNTS2	28
1.27	Cyclosporine et Gramycidine	31
1.28	Effet de la macrocyclisation sur l'entropie de liaison	32
1.29	Utilisation de macrocycles pour imiter les structures secondaires de protéines	33
2.1	Mécanisme de cyclisation par métathèse	35
2.2	Détermination de l'IC ₅₀ d'un composé	36
2.3	La technique de BRET	38
2.4	Mesure du temps de réponse à un stimuli douloureux aigu	39

2.5	Exemple de courbe obtenue avec le modèle de douleur inflammatoire . . .	40
2.6	Méthode de travail pour l'amarrage moléculaire des macrocycles avec le programme Molecular Operating environment (MOE) (ChemComp- Group, 2018)	40
3.1	Structures of the macrocyclic analogues explored in this study.	46
3.2	Macrocyclization reaction	47
3.3	Custom linkers A and B	48
3.4	Macrocycle modelling	50
3.5	Modelling of macrocycle 10	51
3.6	Plasma stability of 10 compared to NT (8-13).	51
3.7	Molecular interactions between hNTS1 and ligands.	56
3.8	Functional activity of 10 compared to NT (8-13).	57
3.9	Competitive binding curves of compounds 1-10 compared to NT (8-13). Obtained by displacement of [¹²⁵ I-Tyr ³]NT	57
4.1	Previously published macrocyclic analogues of NT (8-13).	69
4.2	Design of macrocycles 1 and 2	71
4.3	Synthesis of macrocycle 2 and its linear counterpart 2-L	73
4.4	Molecular docking of prototype macrocycles 1 and 7	76
4.5	Plasma half-life.	77
4.6	<i>In vitro</i> signaling profiles of macrocycles 1 , 3 and 7	81
4.7	Analgesic efficacy of neurotensinergic agonists on acute and tonic pain. .	82
4.8	Effect of 3 , 7 and 11 on body temperature and blood pressure.	84
5.1	Affinité des composés pour NTS2.	99
5.2	Structure des composés 3 , 7 , 16 et 17	100
5.3	Comparaison des affinités pour NTS1 et NTS2	101
5.4	Stabilité plasmatique des composés 16 et 17	102
5.5	Comparaison de Tyr- <i>o</i> -allyl et Trp- <i>N</i> -allyl	103
5.6	Synthèse du Trp acétylé	104

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Ala-scan de la NT (8-13)	17
1.2	Analogues contraints de Bittermann <i>et al.</i> (2004)	18
1.3	Interactions entre NT (8-13) et rNTS1 (White <i>et al.</i> , 2012a)	27
1.4	Équivalences des résidus en contact avec NT (8-13) entre les différents sous-types de récepteurs	28
1.5	Analogues produits par Fanelli <i>et al.</i> (2017)	29
1.6	Analogues produits par Schaab <i>et al.</i> (2014)	30
3.1	Binding affinities	48
4.1	Summary of compounds in this study.	74
4.2	Affinity, potency and stability of the macrocycles.	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- Ac₂O** Anhydride acétique.
- AcOEt** Acétate d'éthyle.
- AMPc** Adénosine Monophosphate cyclique.
- BHE** Barrière hémato-encéphalique.
- BRET** *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*.
- BSA** Bovine Serum Albumine.
- c-Src** Cellular sarcoma kinase.
- CCM** Chromatographie sur couche mince.
- CHO** Chinese Hamster Ovary.
- DBU** 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ène.
- DCE** 1,2-dichloroéthane.
- DCM** Dichlorométhane.
- DIAD** Diisopropyl azodicarboxylate.
- DIEA** Di-isopropyléthylamine.
- DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.
- DMF** *N,N*-Diméthylformamide.
- DMSO** Diméthylsulfoxyde.
- EC₅₀** Concentration effectrice 50.
- EDTA** Ethylenediaminetetraacetic acid.
- ERK** Extracellular signal-regulated kinase.

FBS *Fetal Bovine Serum.*

FDA Food & Drug Administration.

Fmoc Fluorenylmethoxycarbonyl.

GDP Guanosine Diphosphate.

GFP *Green Fluorescent Protein.*

GTP Guanosine Triphosphate.

HATU *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium hexafluorophosphate.

HBSS *Hank's Balanced Salt Solution.*

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid).

HPLC *High Performance Liquid Chromatography*
Chromatographie Liquide à Haute Performance.

i.c.v. Intra cérébroventriculaire.

i.t. Intrathécale.

i.v. Intraveineuse.

IC₅₀ Concentration inhibitrice 50.

IP1 Inositol Monophosphate.

iPrOH Isopropanol.

LPL Lipoprotéine lipase.

MAPK Mitogen-activated protein kinase.

MeOH Méthanol.

MgSO₄ Sulfate de Magnésium.

MS *Mass Spectrometry* (Spectrométrie de masse).

NMP *N*-Methyl-2-pyrrolidone.

Nosyl 2-Nitrobenzenesulfonyl.

NT Neurotensine.

NTS1 Neurotensin Receptor 1.

NTS2 Neurotensin Receptor 2.

NTS3 Neurotensin Receptor 3.

NT (8-13) Neurotensine (8-13).

PAG *Periaqueductal Gray*, Matière grise périaqueductale.

PBS Phosphate-Buffered Saline (Tampon Phosphate Salin).

PEI Polyéthylénimine.

PLC β Phospholipase C β .

PPh₃ Triphénylphosphine.

RAP Receptor-associated protein.

RCM *Ring Closing Metathesis* (Fermeture de cycle par métathèse).

RCPG Récepteur Couplé aux Protéines G.

Rluc *Renilla Luciferase*.

rpm Rotations par minute.

RVM *Rostroventral Medulla*, Bulbe rostro-ventral.

SEM *Standard Error of the Mean* (Erreur standard).

SNC Système nerveux central.

SPPS Synthèse peptidique sur phase solide.

***t*BME** *tert*-Butyl Methyl Éther.

TFA Acide trifluoroacétique.

THF Tétrahydrofurane.

TiS Triisopropylsilane.

Tris Tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

UPLC *Ultra High Performance Liquid Chromatography*©
Chromatographie Liquide Ultra Performante.

1 INTRODUCTION

1.1 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)

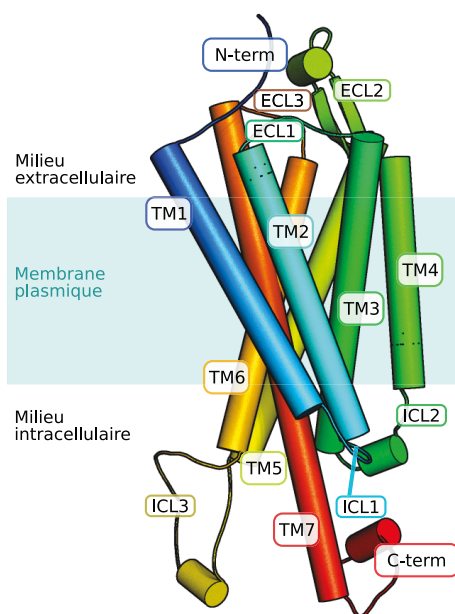


FIGURE 1.1 – Structure canonique d'un récepteur à sept domaines transmembranaires (TM = domaine transmembranaire, ICL = boucle intracellulaire, ECL = boucle extracellulaire).

1.1.1 Importance pharmacologique et utilisations thérapeutiques des RCPG

Les RCPG, aussi appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires en référence à leur structure (figure 1.1), constituent l'une des plus grandes classes de cibles des médicaments. Les composés ciblant des RCPG constituent la plus grande portion des médicaments approuvés par la Food & Drug Administration (FDA) (environ 25 % du total) (Overington *et al.*, 2006).

Il existe plus de 800 gènes codant pour un RCPG dans le génome humain, dont à peu près la moitié sont "non-olfactifs" (et n'ont donc pas de rôle sensoriel, mais possiblement plutôt un rôle physiologique). Parmi ces derniers, 108 sont actuellement la cible de médicaments approuvés et 224 sont la cible de composés en essais cliniques (figure 1.2). Les RCPG reconnaissent des ligands extrêmement diversifiés (petites molécules, peptides, lipides, protéines...) (Gether, 1998; Bondensgaard *et al.*, 2004) et jouent un rôle de transduction

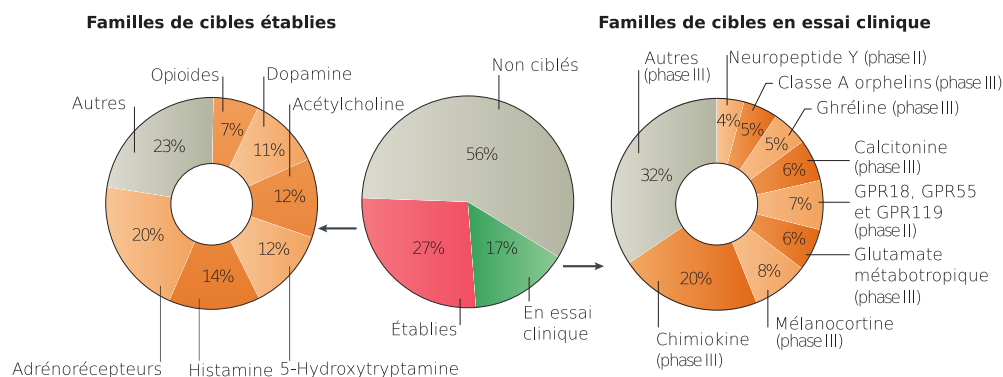


FIGURE 1.2 – Familles de RCPG majeures qui sont des cibles établies ou des cibles de composés en essais cliniques. Il existe 398 RCPG non-olfactifs, parmi lesquels 108 sont la cible de composés approuvés (en rouge), 66 sont la cible de composés en essais cliniques (en vert) et 224 qui ne sont pas encore la cible de médicaments (en gris). Les 108 RCPG qui sont des cibles établies (à gauche) sont principalement des récepteurs aminergiques et opioïdiques, alors que la plupart des cibles des nouveaux composés actuellement en essais cliniques sont des récepteurs peptidergiques (à droite). Traduit de Hauser *et al.* (2017)

du signal, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Filmore, 2004). Ils sont donc essentiels à la communication intercellulaire (on en retrouve notamment beaucoup au niveau synaptique (Chatenet et Hébert, 2017)) et à la réponse des cellules à leur environnement (Allen *et al.*, 2007; Nieto Gutierrez et McDonald, 2017). Ces derniers régulent une grande variété de processus physiologiques, ce qui explique l'intérêt qui leur est porté par la recherche en pharmacologie (Lagerström et Schiöth, 2008; Congreve *et al.*, 2011). Le prix Nobel de Chimie 2012 a d'ailleurs été accordé à Brian K. Kobilka et Robert J. Lefkowitz pour leurs travaux sur la structure et la fonction des RCPG (Lefkowitz, 2004, 2013).

1.1.2 Structure et classification

Tous les RCPG ont la même structure tertiaire caractéristique, c'est-à-dire les sept domaines transmembranaires dont ils tirent leur nom, reliés entre eux par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires, la queue *N*-terminale extracellulaire et la queue *C*-terminale intracellulaire (Rosenbaum *et al.*, 2009).

Les RCPG sont usuellement classés selon leur similarité de structure. Il en existe 5 grandes familles (Fredriksson *et al.*, 2003) (figure 1.3) : Les récepteurs de classe A (apparentés au récepteur de la rhodopsine), de classe B (deux familles, ceux apparentés à la sécrétine et les récepteurs d'adhésion), de classe C (apparentés au récepteur au glutamate) et la famille du récepteur Frizzled/taste receptor 2 (TAS2) (Stevens *et al.*, 2013).

FIGURE 1.3 – Arbre phylogénétique représentant les RCPG. Cet arbre phylogénétique a été construit en utilisant la similarité de séquence des domaines transmembranaires. Les RCPG sont nommés selon le nom de gène utilisé dans la base de données UniProt. Les récepteurs dont la structure a été déterminée (jusqu'à 2013) sont surlignés. Adaptée de Stevens *et al.* (2013)

La numérotation de Ballesteros-Weinstein La numérotation classique des résidus des protéines (numérotation croissante à partir du résidu *N*-terminal de la séquence) peut se révéler impraticable lorsqu'il s'agit de comparer les RCPG entre eux. En effet, les résidus occupant les mêmes positions (relatives aux domaines transmembranaires) porteront des numéros différents d'un récepteur à l'autre.

C'est pour cette raison que la numérotation de Ballesteros-Weinstein a été mise en place ((Ballesteros et Weinstein, 1995)). Celle-ci permet en effet d'unifier la numérotation des RCPG de classe A (apparentés au récepteur de la rhodopsine).

Pour cela, les auteurs ont analysé les séquences des récepteurs de cette classe, ont identifié le résidu le plus conservé dans chaque domaine transmembranaire et leur ont attribué un numéro de type X.50, "X" correspondant au numéro du domaine transmembranaires (figure 1.4). Les autres résidus sont numérotés en fonction de ces résidus les plus conservés, ainsi le résidu venant juste avant 1.50 sera numéroté 1.49, etc. Cette numérotation est parfois plus pratique que la numérotation classique mais présente néanmoins quelques inconvénients, comme le fait qu'elle ne s'applique pas aux boucles, et ne convient que pour les récepteurs de classe A.

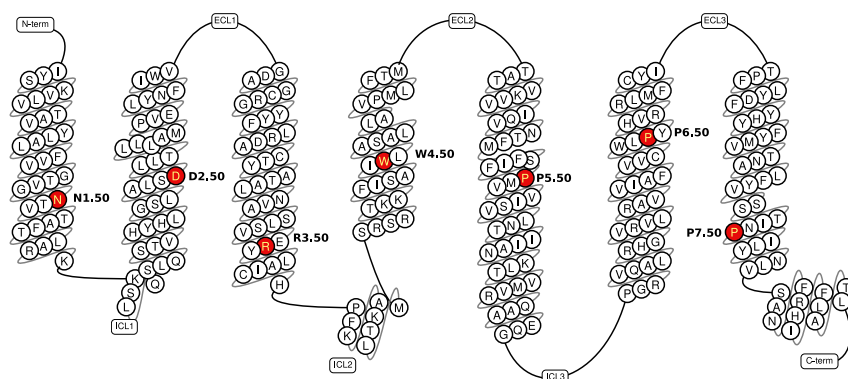


FIGURE 1.4 – Numérotation de Ballesteros-Weinstein (Ballesteros et Weinstein, 1995) Résidus les plus conservés des domaines transmembranaires en rouge. Figure produite à l'aide de <http://www.gpcrdb.org> (Isberg *et al.*, 2015; Pándy-Szekeres *et al.*, 2018)

1.1.3 Signalisation

1.1.3.1 Signalisation dépendante des protéines G

Général - Activation. Le processus d'activation des protéines G par les RCPG est illustré par la figure 1.5. La liaison du ligand au RCPG provoque l'interaction entre la protéine G et le récepteur (Offermanns, 2003; Audet et Bouvier, 2012). La sous-unité α va ensuite

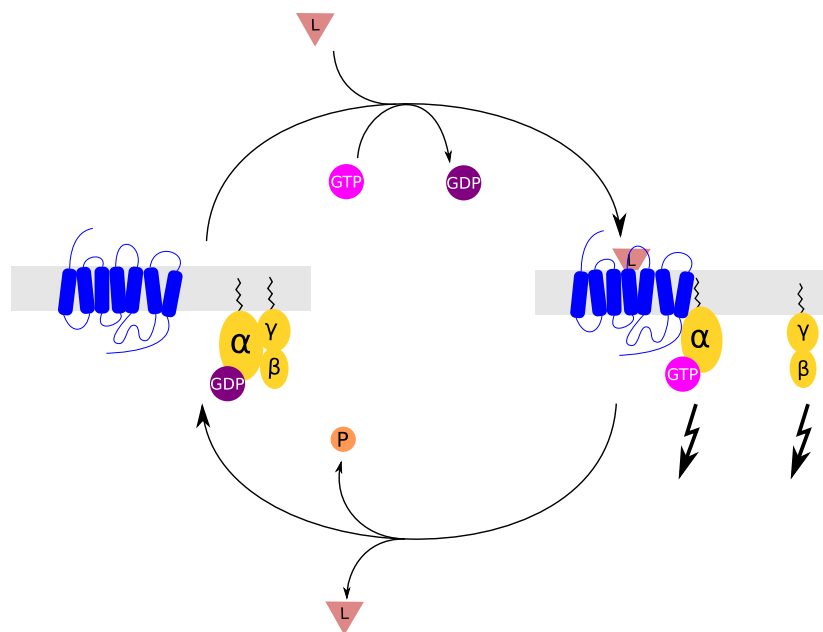


FIGURE 1.5 – Mécanisme d'activation des protéines G par les RCPG.

relâcher une molécule de guanosine diphosphate (GDP), qui sera remplacée par une molécule de guanosine triphosphate (GTP) et se dissocier des sous-unités β et γ . Les sous-unités (α d'un côté, β et γ de l'autre) vont ensuite activer leurs protéines effectrices jusqu'à ce que la sous-unité α hydrolyse la GTP en GDP et s'associe de nouveau aux sous-unités β et γ (Hamm, 1998).

Classification. Il existe plusieurs types de sous-unités α (notées $G\alpha$). Les différents types sont identifiés selon la protéine effectrice avec laquelle la sous-unité interagit. Ainsi $G\alpha_{i/o}$ et $G\alpha_s$ agissent sur l'enzyme adénylate cyclase et influent toutes deux sur la concentration intracellulaire en Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc) (Sunahara *et al.*, 1996). Certaines $G\alpha_{i/o}$ inhibent l'adénylate cyclase, ce qui empêche la production d'AMPc tandis que $G\alpha_s$ stimule cette enzyme, ce qui augmente la concentration en AMPc. La sous-unité $G\alpha_q$ active la phospholipase C β (PLC β) (Exton, 1996), qui produit de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol, et augmente la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Enfin, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ agissent sur l'actine et sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette (Wang *et al.*, 2006) *via* une protéine Rho-GEF.

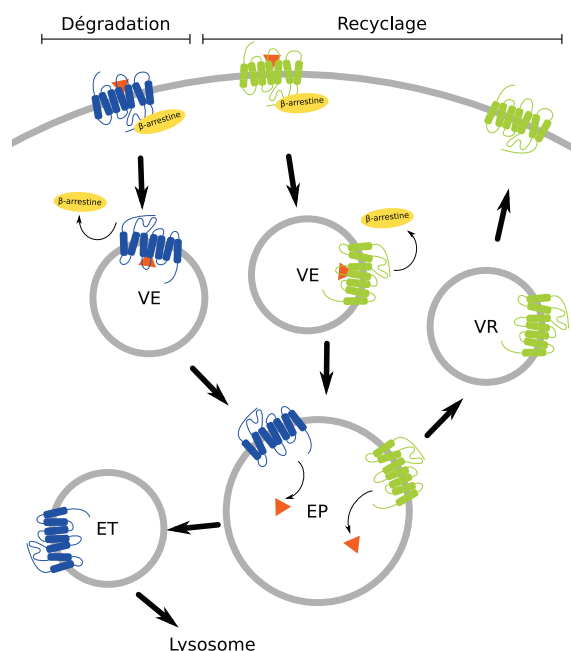


FIGURE 1.6 – Voies de dégradation et recyclage des RCPG. VE : vésicule endosomal ; VR : vésicule de recyclage ; EP : endosome précoce ; ET : endosome tardif.

1.1.3.2 Signalisation indépendante des protéines G

Les arrestines sont nommées ainsi car elles sont impliquées dans l'arrêt de la transmission du signal et dans l'internalisation des récepteurs (figure 1.6) (Oakley *et al.*, 2000). Il en existe quatre sous-types. Les arrestines 1 et 2 sont exprimées quasiment exclusivement dans la rétine tandis que les β -arrestines 1 et 2 sont ubiquitaires (Luttrell et Lefkowitz, 2002). Il a depuis été démontré qu'elles sont aussi impliquées dans des voies de signalisation. Elles peuvent en effet activer plusieurs kinases de type MAPK (mitogen-activated protein kinase) telle que ERK (extracellular signal-regulated kinase) *via* le recrutement de c-Src (voir figure 1.15) (DeWire *et al.*, 2007).

1.1.4 Interactions Ligand / Récepteur

1.1.4.1 Orthostérie / Allostérie

On distingue généralement deux types de ligand selon le site du récepteur auquel ils se lient. Le site de liaison du ligand endogène est considéré comme orthostérique (Neubig *et al.*, 2003). Pour les RCPG de classe A, ce site est généralement la poche au sein des domaines transmembranaires (Gurevich et Gurevich, 2017). Les ligands se liant à un autre site sont dits allostériques (Kenakin, 2004). Ceux-ci interagissent avec une autre par-

tie du récepteur et peuvent influencer sur son activation et/ou sur la liaison d'autres ligands (Smith et Milligan, 2010; Dror *et al.*, 2013).

1.1.4.2 Agonisme / antagonisme

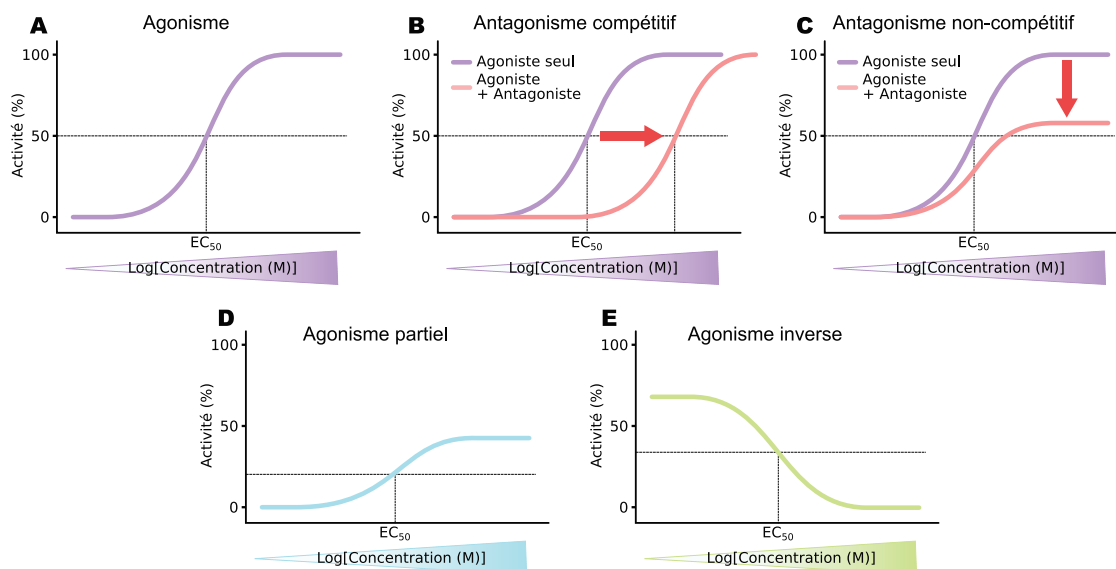


FIGURE 1.7 – Différentes courbes d'activation pouvant être obtenues selon le type de ligand utilisé.

Lorsqu'un ligand se lie à son récepteur, il peut agir sur l'activité de celui-ci de différentes manières. Pour caractériser cela, on quantifie généralement l'activation en fonction de la concentration du ligand. Lorsque le ligand active la voie observée, on observe une courbe d'activation similaire à celle présentée en figure 1.7A et on le qualifie d'agoniste (Kenakin, 2004). Pour comparer les agonistes entre eux on utilise la concentration pour laquelle on atteint 50 % de l'activité maximale (EC₅₀, concentration effectrice 50) (Kenakin, 2017).

Un agoniste qui n'atteint pas 100 % d'activité quelle que soit sa concentration est qualifié d'agoniste partiel (figure 1.7D) (le 100 % étant généralement défini par le maximum d'activité obtenu avec un agoniste de référence, souvent le premier ligand endogène découvert).

Un ligand se liant au récepteur sans activer la voie observée est dit antagoniste. Les caractéristiques d'un agoniste peuvent être influencées par un antagoniste de plusieurs manières. Si les deux ligands se lient au même site sur le récepteur, on parle d'antagonisme compétitif (figure 1.7B). Dans ce cas, l'antagoniste diminue l'affinité apparente de l'agoniste, décalant la courbe d'activation vers la droite. Si les deux ligands ne se lient pas au

même site, on parle d'antagonisme non-compétitif et on observera une modification de l'activité maximale de l'agoniste (figure 1.7C). Les effets des modulateurs allostériques sur l'activation des RCPG sont nombreux et constituent un domaine de recherche à eux seuls (May *et al.*, 2007).

Enfin, dans le cas où un récepteur a une activité constitutive (en l'absence de ligand), on peut observer une diminution de cette activité due à certains ligands que l'on appelle alors agonistes inverses (figure 1.7E) (Sato *et al.*, 2016).

1.1.4.3 Signalisation biaisée

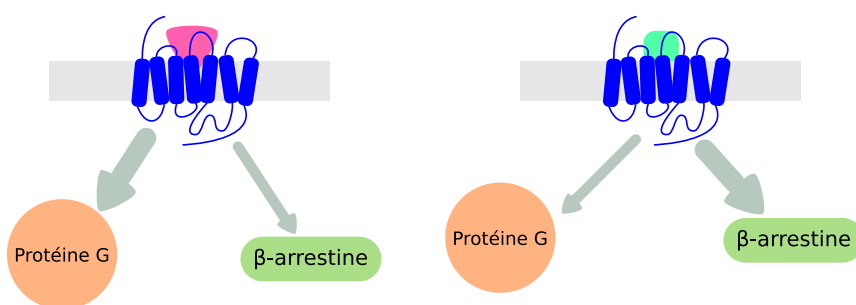


FIGURE 1.8 – Deux ligands activant différemment le même récepteur

Le concept de signalisation biaisée décrit la nature extrêmement dynamique des RCPG (Rajagopal, 2013). Comme on l'a vu dans la section précédente, chaque ligand peut avoir une influence très différente d'un autre ligand sur une voie de signalisation. À cela vient s'ajouter le fait qu'il existe de multiples façons d'activer un RCPG (Kenakin et Christopoulos, 2013b). Un ligand vient en général stabiliser un ensemble de conformations du récepteurs, et celui-ci n'active pas forcément de manière égale toutes les voies de signalisation associées au récepteur (figure 1.8) (Charfi *et al.*, 2014; Rominger *et al.*, 2014). Deux ligands d'un même récepteur peuvent donc avoir deux signatures signalétiques très différentes l'une de l'autre (van der Westhuizen *et al.*, 2014).

On peut donc identifier un biais signalétique en comparant au moins deux ligands (un ligand de référence est nécessaire) sur plusieurs voies de signalisation. (Kenakin *et al.*, 2012; Kenakin et Christopoulos, 2013a). Par exemple sur la figure 1.9, on voit que le ligand biaisé (courbes en orange) active autant la voie 1 que le ligand de référence (courbes en bleu), mais a une meilleure puissance et efficacité sur la voie 2, et un moins bonne puissance et efficacité sur la voie 3.

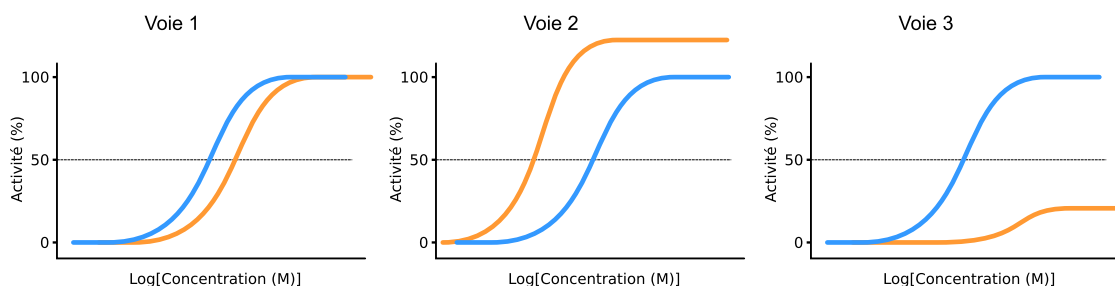


FIGURE 1.9 – Profil signalétique d'un ligand biaisé. Bleu : ligand de référence ; Orange : ligand biaisé

Lorsque les voies de signalisation sont clairement associées à un effet physiologique, la signalisation biaisée peut être un puissant outil pharmacologique pour produire des composés ayant moins d'effets secondaires. (Kenakin et Christopoulos, 2012; Chen *et al.*, 2013). Plusieurs groupes ont ainsi produit des agonistes du récepteur aux opioïdes μ activant la voie $G\alpha_i$ (diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc) mais peu ou pas la voie des β -arrestines. Ces composés conservent l'effet analgésique recherché, mais avec beaucoup moins d'effets indésirables que les opioïdes classiques (Violin *et al.*, 2014; Manglik *et al.*, 2016).

1.2 Le système neurotensinergique

1.2.1 La neurotensine

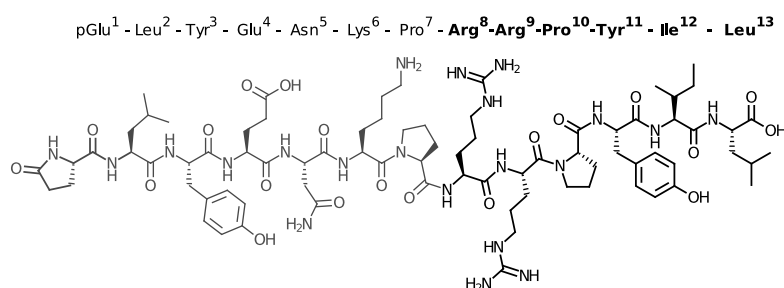


FIGURE 1.10 – Séquence de la neurotensine.

1.2.1.1 Découverte et effets physiologiques

Le tridecapeptide NT, dont la séquence est pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH (figure 1.10), a été découvert en 1973 (Carraway et Leeman, 1973). Ce peptide a été isolé pour la première fois à partir d'extraits d'hypothalamus de bovin, d'où la première partie de son nom ("neuro-"). La deuxième partie du nom ("-tensine") vient

du fait que l'injection par voie intraveineuse (i.v.) de ce peptide à des rats provoque une hypotension aigüe. Son injection i.v. provoque en effet la dégranulation des mastocytes (Lazarus *et al.*, 1977; Rioux *et al.*, 1981). Cet effet est dû à NTS1, voir section 1.2.2.1. NT a également été immédiatement identifié comme capable de provoquer la contraction de l'iléon de cochon d'Inde.

L'expression de NT dans le cerveau a rapidement mené les groupes de recherche à investiguer les effets du peptide au niveau du système nerveux central. L'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) ou intracisternale chez les rongeurs provoque une hypothermie (Nemeroff *et al.*, 1977), ainsi qu'un effet d'atténuation de la douleur (Clineschmidt et McGuffin, 1977; Clineschmidt *et al.*, 1979; Nemeroff *et al.*, 1979).

Cet effet antinociceptif ("nociception" vient du latin *nocere*, qui signifie "faire du mal, causer du tort") de la NT a été démontré dans plusieurs modèles de douleur chez le rongeur. De plus, l'action de NT n'est pas antagonisée par la naloxone (un antagoniste du récepteur aux opioïdes μ) (Clineschmidt *et al.*, 1979). Cette découverte a donc placé le système neurotensinergique en tête de file dans le développement d'analgésiques alternatifs aux opioïdes. Ces derniers, bien que très efficaces pour traiter la douleur, causent également de nombreux effets indésirables tels que dépendance, tolérance, dépression respiratoire et cardiaque, constipation (Simonato, 1996; Bodnar, 2013; Katia, 2015; Trang *et al.*, 2015).

NT et ses récepteurs sont exprimés dans plusieurs circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de la douleur tels que la corne dorsale de la moelle épinière, la matière grise périaqueducatale (PAG), le bulbe rostro-ventral (RVM) et l'hypothalamus (Basbaum et Fields, 1978; Behbehani et Pert, 1984). Des facteurs tels que l'inflammation ou le stress provoquent la sécrétion de NT dans la PAG, ce qui active les cellules "off" du RVM (figure 1.11) (Dobner, 2005, 2006). Ces cellules ont pour fonction d'inhiber la transmission de la douleur lorsqu'elles sont activées (Patrycja et Lipkowski, 2013).

1.2.1.2 Biosynthèse et dégradation

Le gène de la NT a été identifié en 1987 (Dobner *et al.*, 1987). La biosynthèse du peptide commence, comme pour tous les neuropeptides, par la production d'un précurseur (voir figure 1.12). Ce précurseur est appelé proNT/NN car il contient aussi la séquence de la Neuromedine N, un autre neuropeptide. Celui-ci est adressé grâce à une séquence peptide signal en N-terminal, puis clivé plusieurs fois par des convertases afin de donner la NT et/ou la NN (Barbero *et al.*, 1998). Dans le cerveau, le clivage de proNT/NN produit les deux peptides, alors que dans le système digestif on observe surtout la formation de NT (Carraway *et al.*, 1992). Une fois que la maturation du peptide actif est terminée, ce dernier

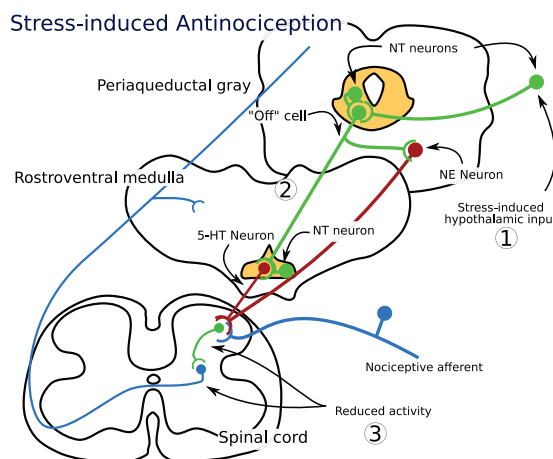


FIGURE 1.11 – Modèle d'inhibition de la douleur par la NT. Adaptée avec permission de Dobner (2006). 1 : Les neurones neurotensinergiques de la PAG sont stimulés (ici par un signal provenant de l'hypothalamus). 2 : Ces mêmes neurones activent les cellules "off" qui communiquent le signal au RVM. 3 : Les neurones du RVM inhibent les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière qui servent à transmettre le signal de douleur.

est stocké dans des granules de sécrétion, et sécrété de manière calcium-dépendante.

Une fois relarguée, la NT est rapidement dégradée par plusieurs métalloprotéases telles que l'endopeptidase 24.11 (qui clive de part et d'autre de la tyrosine 11), l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'endopeptidase 24.15 (qui clive entre l'arginine 8 et l'arginine 9) et enfin la neurolyisine (aussi appelée endopeptidase 24.16) (St-Gelais *et al.*, 2006). Les sites de dégradation se situent principalement sur la partie C-terminale de la NT, en particulier entre les positions Arg⁸ et Arg⁹, et de part et d'autre de la Tyr¹¹ (Vincent *et al.*, 1999).

système nerveux central (SNC) (Patrycja et Lipkowski, 2013).

Il a été reconnu comme responsable de l'effet hypotenseur lors de l'injection systémique de NT, puisque cet effet est antagonisé par l'action d'un antagoniste sélectif de NTS1 (Gully *et al.*, 1997; Kaczyńska et Szereda-Przestaszewska, 2012). NT provoque la relâche d'histamine par les mastocytes (Lazarus *et al.*, 1977) ainsi que de prostacycline par les cellules endothéliales (Schaeffer *et al.*, 1997) (bien que NTS1 ne soit pas exprimé dans ces dernières (Regard *et al.*, 2008)), ce qui provoque l'hypotension. L'effet est immédiatement suivi d'une courte hypertension due à la relâche de catécholamine (Rioux *et al.*, 1989), puis d'une hypotension prolongée (figure 1.14).

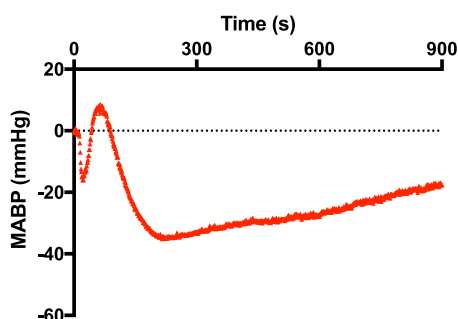


FIGURE 1.14 – Profil typique de l'évolution de la tension artérielle moyenne après injection de NT

La voie de signalisation qui lui est canoniquement associée est l'augmentation de calcium intracellulaire (donc une interaction avec $G\alpha_q$), mais il est de plus en plus démontré que les RCPG peuvent activer plusieurs voies de signalisation, et NTS1 ne fait pas exception à cette règle (Pelaprat, 2006; Besserer-Offroy *et al.*, 2017). NTS1 peut donc activer $G\alpha_q$ mais aussi $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{13}$ et évidemment se lier aux β -arrestines (figure 1.15). Il est d'ailleurs internalisé suite à son activation par NT, puis dirigé vers les lysosomes et dégradé (Mazella et Vincent, 2006b).

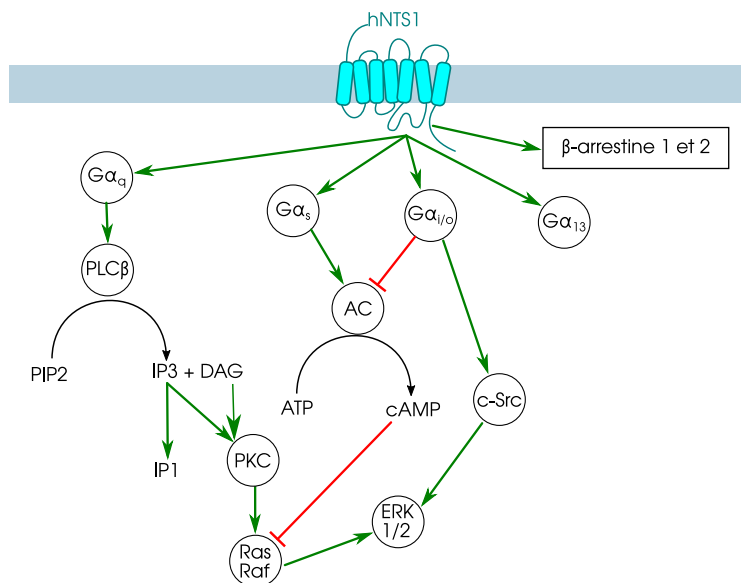


FIGURE 1.15 – Signature signalétique du récepteur NTS1 humain. Adaptée de Besserer-Offroy *et al.* (2017)

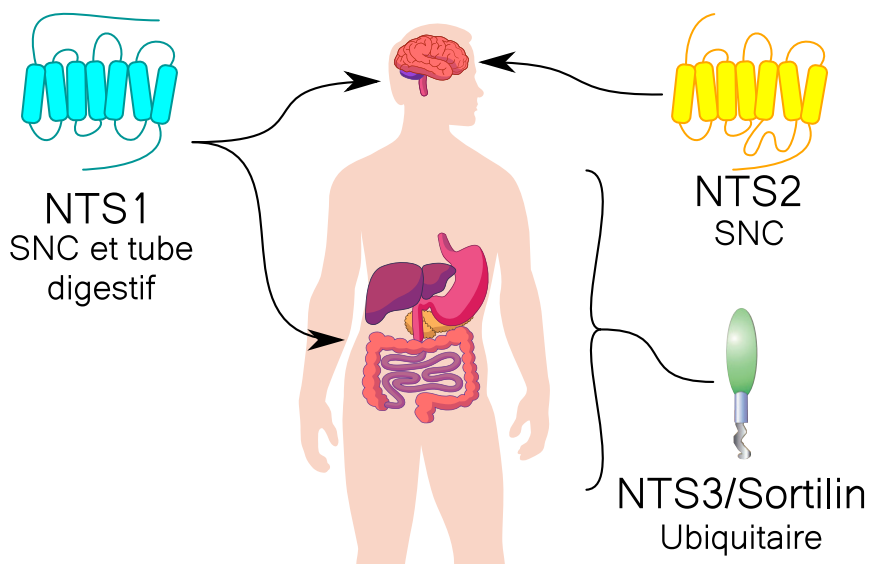


FIGURE 1.16 – Expression des récepteurs à la NT

1.2.2.2 NTS2

Le récepteur NTS2 humain a été identifié et cloné un peu plus tard que NTS1 (Chalon *et al.*, 1996). Il comporte 64 % d'homologie avec le récepteur NTS1 humain (Patrycja et Lipkowski, 2013). Il est exprimé seulement dans le SNC, mais pas forcément aux mêmes endroits que NTS1 (Mazella *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1999; Patrycja et Lipkowski, 2013). On sait que contrairement à NTS1, NTS2 est recyclé à la membrane suite à son internalisation (Mazella et Vincent, 2006b).

Il existe peu de données concernant sa signature signalétique (Richard *et al.*, 2001), et ces données peuvent être contradictoires selon le type de cellules utilisé (Pelaprat, 2006). Pour cette raison, son implication dans l'analgésie a été mise en doute, puis on a pensé qu'il en était le seul responsable (Dubuc *et al.*, 1999; Sarret *et al.*, 2005). Finalement, les deux récepteurs sont capables d'induire un effet analgésique dose-dépendant à la NT (Mazella et Vincent, 2006a; Roussy *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2012). En revanche, l'activation de NTS2 ne provoque pas d'hypotension ni d'hypothermie (Tétreault *et al.*, 2013).

1.2.2.3 NTS3

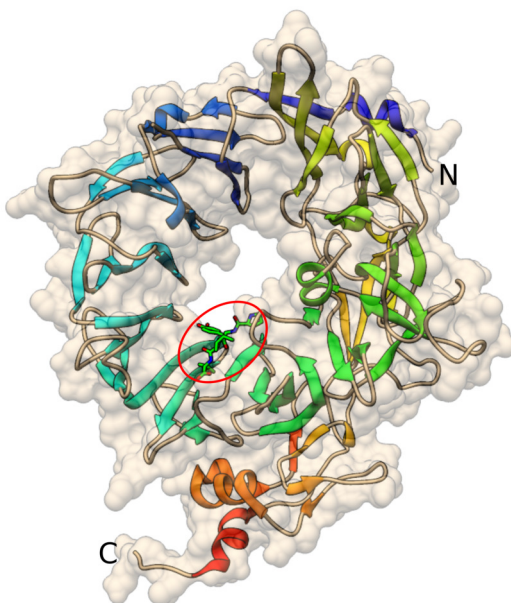


FIGURE 1.17 – Structure du domaine extracellulaire du récepteur NTS3/gp95/Sortiline. Celui-ci a été cristallisé avec la NT (entouré en rouge, seuls les résidus Pro¹⁰-Tyr¹¹-Ile¹²-Leu¹³ apparaissent). pdb ID 3F6K (Quistgaard *et al.*, 2009)

Le récepteur NTS3 est complètement différent des deux autres récepteurs (figure 1.16). C'est un récepteur membranaire de type I à un seul domaine transmembranaire de 100 kDa qui est 100 % identique à la protéine sortiline (Mazella *et al.*, 1998). Celui-ci existe sous forme membranaire, mais aussi sous forme soluble due à la présence d'un site de clivage par la furine (Petersen *et al.*, 1999). La forme soluble a d'ailleurs une meilleure affinité pour NT que la forme membranaire (Navarro *et al.*, 2001). NTS3/sortiline reconnaît plusieurs ligands autres que la NT, notamment des protéines comme par exemple RAP (receptor-associated protein) et LPL (lipoprotéine lipase). Ces ligands, comme la NT, peuvent être internalisés suite à la liaison avec NTS3/sortiline.

Il a aussi été montré qu'en présence de NT, NTS1 et NTS3 peuvent former un complexe qui est internalisé (Mazella et Vincent, 2006b).

Concernant sa signalisation, il semble que NTS3/sortiline module la phosphorylation de MAPK et aurait donc un effet anti-apoptotique (Jansen *et al.*, 2007).

1.3 Relation Structure – Activité

1.3.1 Alanine scan

8	9	10	11	12	13	Facteur IC ₅₀
Arg	Arg	Pro	Tyr	Ile	Leu	1
Ala	Arg	Pro	Tyr	Ile	Leu	1,4
Arg	Ala	Pro	Tyr	Ile	Leu	5
Arg	Arg	Ala	Tyr	Ile	Leu	54
Arg	Arg	Pro	Ala	Ile	Leu	28 300
Arg	Arg	Pro	Tyr	Ala	Leu	1 050
Arg	Arg	Pro	Tyr	Ile	Ala	556
Lys	Lys	Pro	Tyr	Ile	Leu	1,3

Tableau 1.1 – Ala-scan de la NT (8-13). Le facteur IC₅₀ correspond au ratio $\frac{IC_{50} \text{ Composé}}{IC_{50} \text{ Neurotensine}}$.
Adaptée de Barroso *et al.* (2000)

Il a rapidement été démontré que le fragment C-terminal de NT (composé des 6 derniers acides aminés) est nécessaire et suffisant pour conserver toute l'affinité et l'activité du peptide complet (Kitabgi *et al.*, 1980; Kitabgi, 1982). Le peptide de 6 acides aminés composé des acides aminés 8 à 13 de NT est depuis utilisé comme point de départ de la plupart des études de relation structure-activité sous la dénomination NT (8-13).

Un "alanine-scan" (le remplacement successif de chaque résidu du peptide par une alanine) de NT (8-13) a ensuite permis de caractériser plus avant l'importance de chaque acide aminé (voir tableau 1.1) (Barroso *et al.*, 2000). Ainsi, on voit que la tyrosine 11 est essentielle pour l'affinité avec NTS1 (son remplacement fait perdre un facteur 30 000). L'isoleucine 12 et la leucine 13 sont aussi très importantes (diminution de l'affinité d'un facteur 1 000 et 500, respectivement). Vient ensuite la proline 12 (facteur 50), puis l'arginine 9, dont le remplacement induit une perte d'affinité sensiblement plus grande que le remplacement de l'arginine 8 (diminution d'un facteur 5 et 1.5, respectivement). De plus, le remplacement simultané des deux arginines par des lysines ne diminue que très marginalement l'affinité.

1.3.2 Analogues linéaires

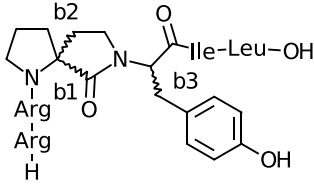
	b1	b2	b3	K _i (nM)
	1	2	3	12
	1	2	3	17 000
	1	2	3	> 100 000
	1	2	3	14 000
				[NMeTyr ¹¹]NT(8-13) 1 400

Tableau 1.2 – Analogues contraints. Adaptée de Bittermann *et al.* (2004) avec permission. Copyright (2004) American Chemical Society.

Contrôle structural. Dans l'optique de contrôler la conformation de NT (8-13), Bittermann *et al.* (2004) ont produit les composés présentés dans le tableau 1.2. Ceux-ci comportent un cycle à cinq membres entre l'amine α de la tyrosine 11 et le carbone α de la proline 10, ce qui permet de contraindre l'angle Ψ de la proline 10. Le composé **1** comporte une proline L, tandis que le composé **2** comporte une proline D. Les composés **3** et **4** sont équivalents aux composés **1** et **2** (respectivement) mais avec une tyrosine D. Les auteurs ont aussi synthétisé [NMeTyr¹¹]NT (8-13) comme contrôle.

Une représentation en trois dimensions de ces composés (figure 1.18) leur a permis de supposer que **1** (et **3**) avait des valeurs d'angles correspondant à une conformation linéaire du peptide, tandis que **2** (et **4**) adoptait une conformation en coude.

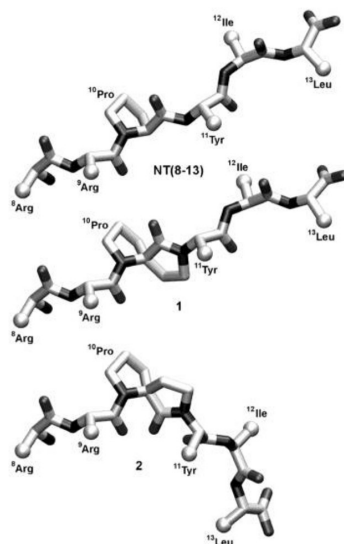


FIGURE 1.18 – Structures 3D des analogues contraints. Adaptée de (Bittermann *et al.*, 2004) avec permission. Copyright (2004) American Chemical Society.

Les valeurs de K_i (obtenues sur des membranes de cellules porcines) sont rapportées dans le tableau 1.2. Le seul composé à posséder une forte affinité est le **1** (12 nM). Il semble donc bien que la conformation linéaire soit privilégiée (composé **1**) par rapport à la conformation en coude (composé **2**, $K_i = 17 \mu\text{M}$). L'inversion de la configuration de la tyrosine est quant à elle fortement défavorable, comme le montrent les valeurs de K_i des composés **3** et **4** (> 100 et $14 \mu\text{M}$, respectivement).

Il est primordial de noter ici que l'analogue de contrôle (non contraint, donc plus flexible) [NMeTyr¹¹]NT (8-13) a une affinité bien plus faible que le composé **1** (1 400 nM contre 12 nM, respectivement, cf. tableau 1.2). Ceci montre que la perte d'un donneur de pont hydrogène à cette position a une forte influence négative sur l'affinité (pour comparaison, les auteurs rapportent un K_i de 1.3 nM pour la NT avec cet essai). Pourtant, le composé **1** possède une très forte affinité malgré l'absence de ce donneur de pont hydrogène.

Les auteurs attribuent donc ce gain à la perte d'entropie causée par la contrainte du ligand et suggèrent que le peptide endogène adopte une conformation linéaire au sein de la poche de liaison.

Amélioration des propriétés pharmacocinétiques. Afin d'améliorer les propriétés de NT (8-13) telles que la résistance aux protéases ou la biodisponibilité, diverses stratégies ont été appliquées. Les liens amides de la chaîne peptidique ont par exemple pu être protégés de la dégradation grâce à la *N*-méthylation (Tyler *et al.*, 1999; Härterich *et al.*, 2008; Fanelli *et al.*, 2015) ou bien par leur remplacement par un lien amine (lien amide réduit) (Wustrow *et al.*, 1995; Petrie *et al.*, 2004; Härterich *et al.*, 2008).

La figure 1.19 montre deux exemples du succès de ces stratégies, les composés NT69L (NMeArg-Lys-Pro-*Neo*Trp-*t*Leu-Leu-OH) (Tyler-McMahon *et al.*, 2000) et PD149163 (H-Lys-[ΨCH₂NH]-Lys-Pro-Trp-*t*Leu-Leu-OEt) (Petrie *et al.*, 2004).

NT69L comporte une arginine *N*-méthylée en *N*-terminal, et deux des acides aminés de la séquence de NT (8-13) sont remplacés par des acides aminés non-naturels : la tyrosine 11 par un analogue non-naturel du tryptophane, le *neo*-tryptophane, et l'isoleucine 12 par une *tert*-leucine.

Ce composé possède une très bonne affinité pour les deux récepteurs humains NTS1 et NTS2 (1.55 et 2.1 nM, respectivement). Bien qu'il n'ait pas été rapporté de valeurs de demi-vie *in vitro* ou *in vivo*, ses effets hypothermiants et analgésiques sont persistants pendant plusieurs heures après une seule injection ; 7 heures pour l'hypothermie et 5 heures pour l'analgésie après injection intrapéritonéale à des rats dans les deux cas (Tyler-

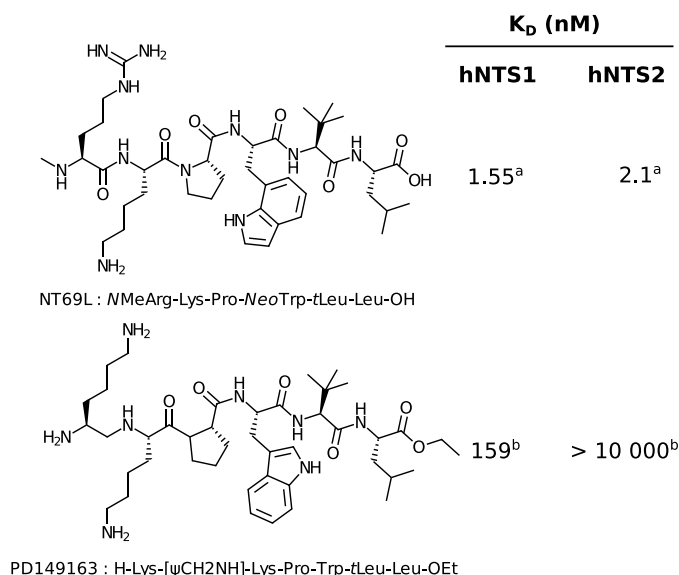


FIGURE 1.19 – Les analogues traversant la BHE NT69L et PD 149163. (a) Tyler-Mcmahon *et al.* (2000); (b) Petrie *et al.* (2004)

Mcmahon *et al.*, 2000). Cet analogue apparaît donc bien plus stable *in vivo* que NT, mais aussi capable d'atteindre le SNC après administration périphérique.

Le deuxième peptide montré dans la figure 1.19 est le PD149163 (H-Lys-[ΨCH₂NH]-Lys-Pro-Trp-*t*Leu-Leu-OEt). Celui-ci comporte deux lysines avec un lien peptidique réduit entre les deux, un tryptophane en position 11 et une *tert*-leucine en position 12. C'est aussi le seul analogue de NT (8-13) rapporté avec un ester éthylique en C-terminal. Son affinité pour NTS1 est plus modérée que celle du même peptide avec l'acide carboxylique libre (K_i 159 nM et 1.13 nM, respectivement (Wustrow *et al.*, 1995)) L'ester est sélectif pour le récepteur NTS1 (aucune affinité pour NTS2) et est capable d'induire de l'hypothermie et de l'hypotension chez le rat (Petrie *et al.*, 2004). Son action analgésique a aussi été démontrée (Fanelli *et al.*, 2015), ainsi que sa capacité à traverser la BHE (Feifel *et al.*, 1999, 2003).

Acides aminés silylés. Une stratégie possible pour augmenter la biodisponibilité des peptides est d'augmenter leur lipophilicité. Dans ce but, plusieurs analogues de NT (8-13) comportant un ou des acides aminés silylés ont été produits (figure 1.20).

Cavelier *et al.* (2002) ont par exemple produit l'analogue H-Lys-Lys-Sip-Tyr-Ile-Leu-OH, où la proline 10 de NT (8-13) a été remplacée par une γ -(diméthylsila)-proline (silaproline, abrégée Sip), conserve une bonne affinité pour NTS1 et NTS2 (17 et 5 nM, respectivement). Les auteurs ont utilisé diverses techniques d'analyse structurales (telles que la

diffraction des rayons X, l'absorption infra-rouge et la RMN) pour prouver que le résidu et le peptide adoptaient une conformation similaire à la proline, et mentionnent que leur peptide est plus lipophile et plus résistant aux protéases que la NT (8-13).

Dans la même optique, une série d'analogues contenant l'acide aminé triméthylsilyl-alanine (TMS-Ala) en remplacement de l'un des deux acides aminés C-terminal a été produit par Fanelli *et al.* (2015) (figure 1.20). Ceux ayant un résidu TMS-Ala en position 12 (H-Lys-Lys-Sip-Tyr-TMS-Ala-Leu-OH et H-Lys-Lys-Pro-Tyr-TMS-Ala-Leu-OH) avaient une affinité réduite pour les deux récepteurs (par rapport à NT (8-13)), avec une préférence sensible pour NTS1.

En revanche, celui comportant un résidu TMS-Ala en position 13 (H-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-TMS-Ala-OH) possède une meilleure affinité que NT (8-13) sur les deux récepteurs (IC_{50} pour NTS1 = 0.02 nM ; IC_{50} pour NTS2 = 0.26 nM). Ce composé a montré sa capacité à induire un puissant effet analgésique après injection intrathécale (i.t.), mais un essai de stabilité *in vitro* a révélé une demi-vie dans le plasma très proche de celle de la NT (8-13) (autour de 1.5 minutes pour les deux composés) (Fanelli *et al.*, 2015).

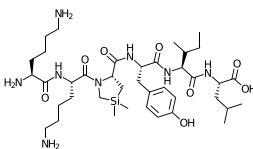
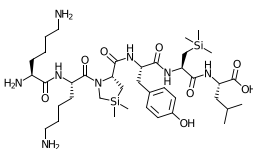
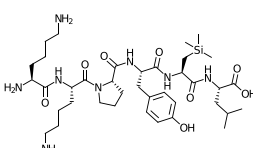
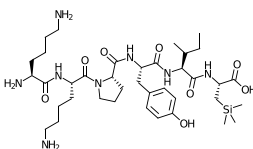
	IC_{50} (nM)		Ratio de sélectivité
	hNTS1	hNTS2	
 H-Lys-Lys-Sip-Tyr-Ile-Leu-OH ^a	17	5	3.4
 H-Lys-Lys-Sip-Tyr-TMS-Ala-Leu-OH ^b	968	1 425	0.7
 H-Lys-Lys-Pro-Tyr-TMS-Ala-Leu-OH ^b	94	405	0.2
 H-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-TMS-Ala-OH ^b	0.02	0.26	0.1

FIGURE 1.20 – Analogues comportant un ou des résidus silylés. (a) Cavalier *et al.* (2002) ; (b) Fanelli *et al.* (2015)

1.3.3 Analogues macrocycliques

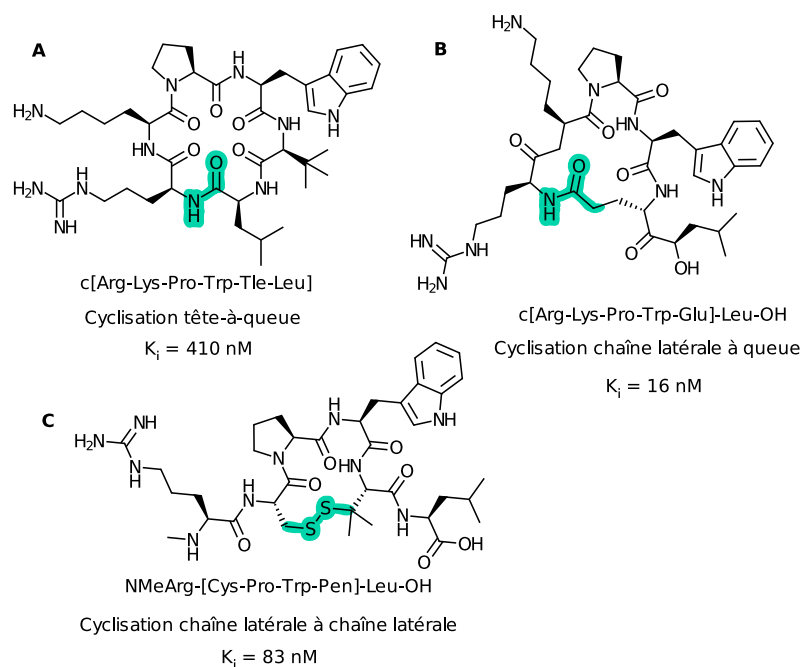


FIGURE 1.21 – Sefler *et al.* (1995) ont produit des macrocycles tête-à-queue, chaîne latérale à queue et chaîne latérale à chaîne latérale. Valeurs de K_i obtenues pour le récepteur NTS1 de souris.

Le groupe de Sefler *et al.* (1995) a été le premier à rapporter dans la littérature des analogues macrocycliques de NT (8-13). Un nombre conséquent de macrocycle est rapporté. Ceux-ci montrent d'ailleurs une diversité de cyclisation intéressante. En effet, les auteurs ont aussi bien produit des analogues macrocyclisés par un lien amide entre les deux extrémités du peptide (figure 1.21A), macrocyclisés d'une chaîne latérale à l'amine terminale du peptide par un lien amide (figure 1.21B) ou bien par un pont disulfure entre deux chaînes latérales (figure 1.21C).

L'affinité relativement bonne (410 nM) du macrocycle tête-à-queue (A) est pour le moins intrigante étant donné que, comme dit plus haut (section 1.3.1) la présence de l'acide carboxylique libre a été précédemment qualifiée de déterminante pour l'affinité (Einsiedel *et al.*, 2008). Cela semble pourtant congruent avec le fait qu'à la même période, Van Kemmel *et al.* (1996) ont montré des résultats positifs avec un analogue macrocyclique tête-à-queue de NT (8-13), c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (celui-ci a un K_i pour NTS1 de 300 nM, voir figure 1.22).

Les deux autres macrocycles de Sefler *et al.* (1995) présentés ici (figure 1.21B et C, ayant

des K_i de 16 et 83 nM, respectivement) semblent montrer qu'une contrainte de la partie centrale du peptide est plutôt favorable à la liaison avec le récepteur. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que la NT (8-13) pourrait adopter une conformation en coude au sein de la poche de liaison. Cependant ces résultats, obtenus sur des extraits de cerveaux de souris, doivent être mis en perspective par ceux obtenus plus tard par les mêmes auteurs sur des cellules HT-29 exprimant le récepteur humain (Akunne *et al.*, 1996). En effet avec cet essai, les K_i des composés A et C se sont avérés beaucoup plus faibles, avec des valeurs de 1 et 4 μ M, respectivement. Ils sont d'ailleurs apparus inactifs sur un essai de mesure de la concentration de calcium intracellulaire. Seul le composé B semblait conserver une affinité et une activité acceptables (190 et 130 nM, respectivement).

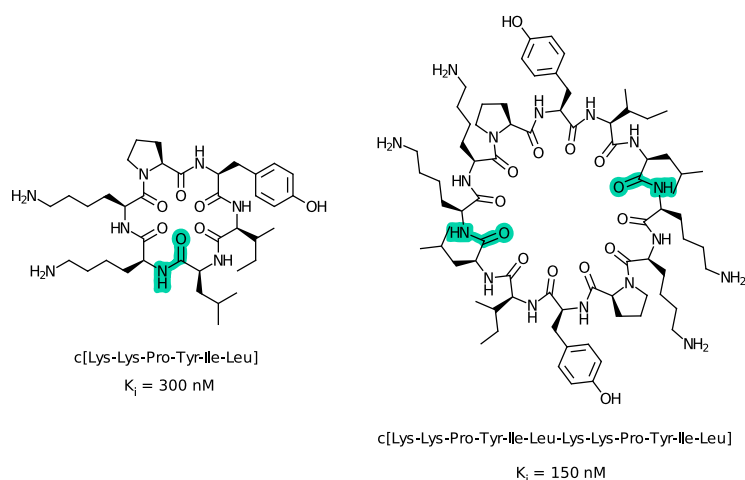


FIGURE 1.22 – Analogues macrocycliques tête-à-queue de la NT (8-13)

Les données d'affinité et d'activité n'étant pas cohérentes d'un article à l'autre du même groupe pour les mêmes composés (Akunne *et al.*, 1996; Heyl *et al.*, 1994), cela rend difficile l'interprétation des résultats rapportés. Il n'existe par ailleurs pas de donnée concernant l'affinité pour NTS2 ou la stabilité de ces composés. Les cerveaux de souris exprimant les deux récepteurs, on peut se demander si l'affinité de ces composés observée dans le premier article (Seftler *et al.*, 1995) ne seraient pas dû à une liaison à NTS2 (étant donné que les cellules HT-29 utilisées dans le deuxième article (Akunne *et al.*, 1996) n'expriment que NTS1). D'autant plus que les séquences des deux récepteurs sont très bien conservées chez le rat, la souris et l'humain, *a fortiori* au niveau des résidus interagissant directement avec la NT (voir tableau 1.4). L'hypothèse d'une sélectivité de sous-types (NTS1 *vs.* NTS2) est donc à privilégier par rapport à une sélectivité entre espèces. Malheureusement, aucune donnée ne permettant de confirmer ceci n'a été publiée. Malgré tout, le macrocycle tête-à-queue c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (Van Kemmel *et al.*,

1996) et son dimère c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (Bredeloux *et al.*, 2008) (figure 1.22) ont tous deux une affinité acceptable pour le récepteur NTS1 (K_i 300 et 150 nM, respectivement). Ici non plus, il n'existe pas de données concernant l'affinité de ces composés pour NTS2, ni même de données *in vitro* sur l'activation de NTS1 ou encore des données structurales permettant de formuler des hypothèse sur la façon dont ces composés se lient au récepteur.

Toutefois, les données *in vivo* sont intéressantes. En effet, le monomère c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) est capable d'induire une hypothermie (un effet associé à NTS1) durant plus de trois heures suite à une injection i.c.v., mais aussi durant plus d'une heure après injection i.v. Les auteurs suggèrent donc que leur composé présente une résistance accrue aux protéases, mais aussi qu'il a la capacité de traverser la BHE (Van Kemmel *et al.*, 1996). Ils n'ont malheureusement pas publié plus de données concernant ce composé depuis.

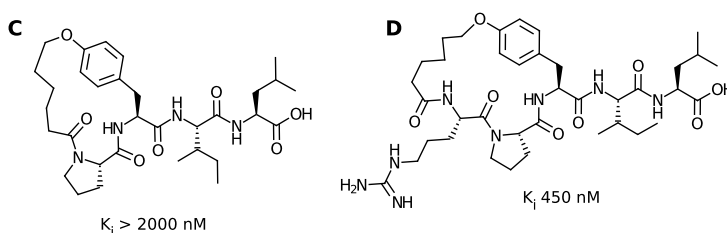


FIGURE 1.23 – Analogues macrocycliques chaîne latérale à queue par Lundquist et Dix (1999)

Les données sont plus complètes pour le composé dimérique c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (Bredeloux *et al.*, 2008). Comme le monomère, celui-ci induit une hypothermie durable après injection i.c.v. et après injection i.v. De la même manière, celui-ci induit un effet analgésique non seulement après une injection i.c.v., mais aussi après injection i.v., et même après administration par voie orale.

Les auteurs attribuent ceci à une plus grande stabilité (résistance aux protéases) de leur composé et considèrent ces données comme une preuve de sa capacité à traverser la BHE mais ne commentent pas sur sa manière de traverser. La masse molaire élevée et les charges positives du macrocycle rendent en effet difficile à accepter que celui-ci diffuse de manière passive à travers les cellules épithéliales et la BHE.

Enfin, Lundquist et Dix (1999) ont entrepris de produire deux peptides macrocyclisés entre la tyrosine (en position 11 sur NT) et l'extrémité *N*-terminale (figure 1.23). Ils ont pour cela remplacé l'une des arginines en position 8 ou 9 par un acide 6-bromohexanoïque afin de substituer le brome par l'hydroxyle de la tyrosine.

Ceci a produit les composés C et D (figure 1.23). Le composé C a montré une très faible affinité pour NTS1 (testé sur des cellules CHO exprimant le récepteur humain), ce qui n'est pas étonnant étant donné que l'acide 6-bromohexanoïque couplé directement sur la proline impose l'absence des deux arginines.

Le composé D, en revanche, comporte une arginine endocyclique (équivalente à la position 9 de NT). Cela lui confère une meilleure affinité pour le récepteur NTS1 (450 nM), mais on reste encore bien loin de l'affinité du peptide de référence.

1.3.4 Antagonistes

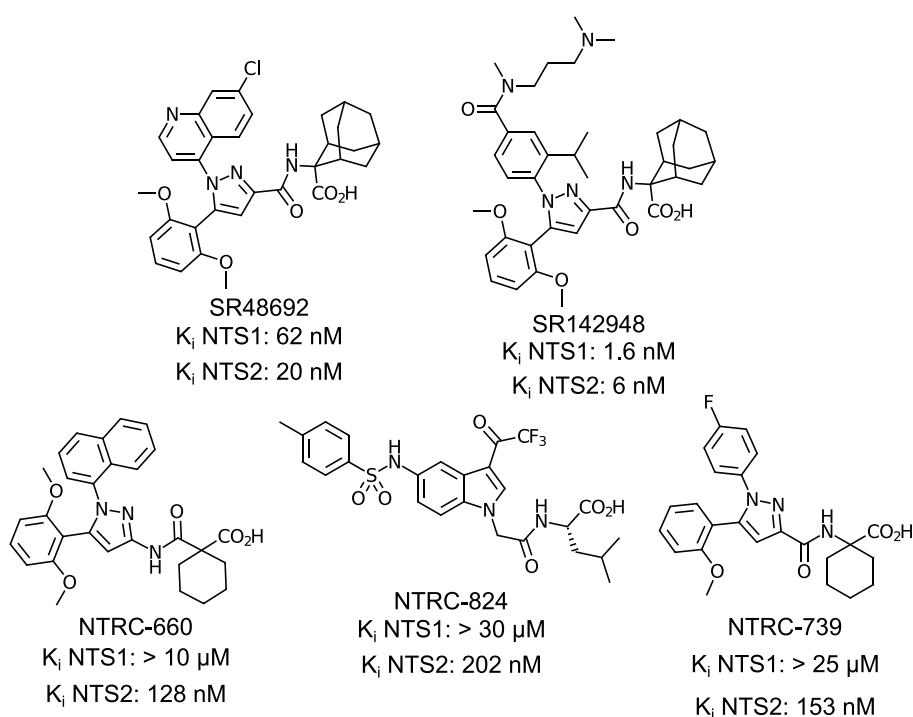


FIGURE 1.24 – Antagonistes des récepteurs neurotensinergiques.

Les premiers antagonistes des récepteurs à la NT sont les composés SR 48692 (Gully *et al.*, 1993; Labbé-Jullié *et al.*, 1995) et SR 142948A (Gully *et al.*, 1997) (figure 1.24). Les auteurs décrivent uniquement la caractérisation et la relation structure-activité de ces composés non-peptidiques, sans malheureusement évoquer leur découverte, probablement grâce à un criblage haut débit. Ces composés ont néanmoins une forte affinité pour les récepteurs NTS1 et NTS2 et bloque l'activité du peptide.

À partir de ces structures, des études systématiques de relation structure-activité ont mené au développement d'autres antagonistes qui sont, eux, sélectifs envers NTS2 : NTRC-660

(Thomas *et al.*, 2015), NTRC-739 (Thomas *et al.*, 2014), et NTRC-824 (Thomas *et al.*, 2016) (figure 1.24).

Il est intéressant de noter que ces structures non-peptidiques ont tout de même plusieurs points communs avec la structure de la NT (8-13), notamment la présence d'un acide aminé aliphatique avec un acide carboxylique libre et un noyau aromatique possiblement équivalent à celui de la tyrosine.

1.3.5 Structure cristallographique du récepteur NTS1 de rat

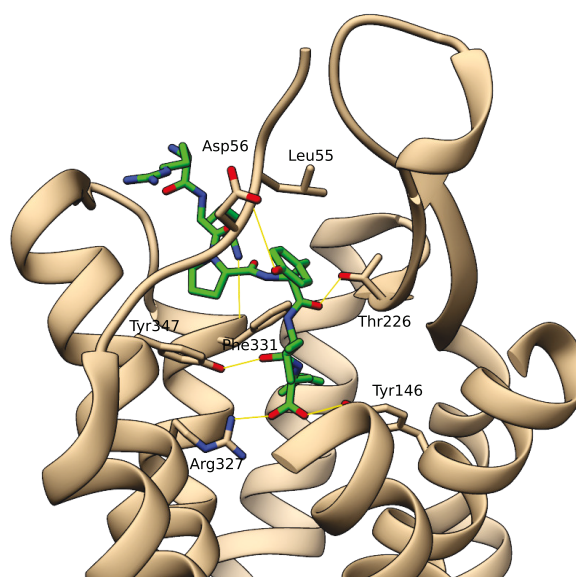


FIGURE 1.25 – Structure par cristallographie du récepteur NTS1 de rat avec la NT (8-13) (en vert). Jaune : Ponts hydrogènes entre le ligand et le récepteur. PDB ID : 4grv (White *et al.*, 2012a)

La première structure cristallographique du récepteur NTS1 a été publiée par White *et al.* (2012a). Celle-ci est sortie à une période prolifique en terme de détermination de structure de RCPG par cristallographie (les structures des récepteurs aux opioïdes μ , δ et κ ont été publiées la même année, par exemple) (Katritch *et al.*, 2013), mais possède une particularité très intéressante. En effet, c'est le seul exemple de RCPG peptidergique co-cristallisé avec son ligand peptidique "endogène" (Krumm et Grisshammer, 2015) ; il s'agit en fait ici de NT (8-13), qui n'est qu'une fraction de la séquence du peptide endogène (la partie C-terminale). C'est cependant, comme dit plus haut, le plus petit fragment conservant toute l'affinité de la NT complète. On voit d'ailleurs (figure 1.25) que la partie N-terminale, si elle était présente, serait à l'extérieur du site de liaison.

Cette structure a révélé que la NT (8-13) adopte une forme plutôt linéaire au sein de la

Résidu NT (8-13)	Type d'interaction	Résidu NTS1 ^a
Arg ⁹	Chaîne lat. → Carbonyle	Phe331 (6.51)
Tyr ¹¹	Chaîne lat. → Carbonyle	Leu55 (N-ter)
Tyr ¹¹	Carbonyle → Chaîne lat.	Thr226 (ECL2)
Ile ¹²	Carbonyle → Chaîne lat.	Tyr347 (7.31)
Leu ¹³	Acide carboxylique → Chaîne lat.	Arg327 (6.54)
Leu ¹³	Carbonyle → Chaîne lat.	Tyr146 (3.29)

Tableau 1.3 – Interactions entre NT (8-13) et rNTS1 (White *et al.*, 2012a)

poche de liaison, avec l'acide carboxylique plongeant au fond pour former une interaction ionique avec l'arginine 327 du TM6 (voir tableau 1.3). Les arginines du peptide sont quant à elles situées à l'interface entre le récepteur et le milieu extracellulaire. Cette proximité avec l'eau explique peut-être pourquoi aucune interaction de type ionique n'est observée entre les arginines et le récepteur, et pourrait indiquer une certaine flexibilité à cet endroit.

Notons que le récepteur cristallisé (avec une résolution de 2.8 Å) est le NTS1 de l'espèce *Rattus norvegicus*, qui possède 89 % d'homologie de séquence avec le récepteur NTS1 humain, et 57 % avec le récepteur NTS2 humain. Les résidus du récepteur de rat interagissant avec le ligand sont conservés dans la séquence du récepteur humain, tel que montré dans le tableau 1.4.

Cette publication est donc une ressource inestimable d'information pour la conception rationnelle d'analogues de la NT (8-13). Par rapport à notre projet, la plupart des composés décrits au chapitre 3 ont été produits avant la publication de cette structure. D'autres structures du même récepteur ont été publiées à sa suite, et sont venues confirmer les informations précédentes en ce qui concerne le site de liaison et les interactions avec le ligand (Egloff *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Krumm *et al.*, 2016).

1.3.6 Analogues sélectifs envers NTS2

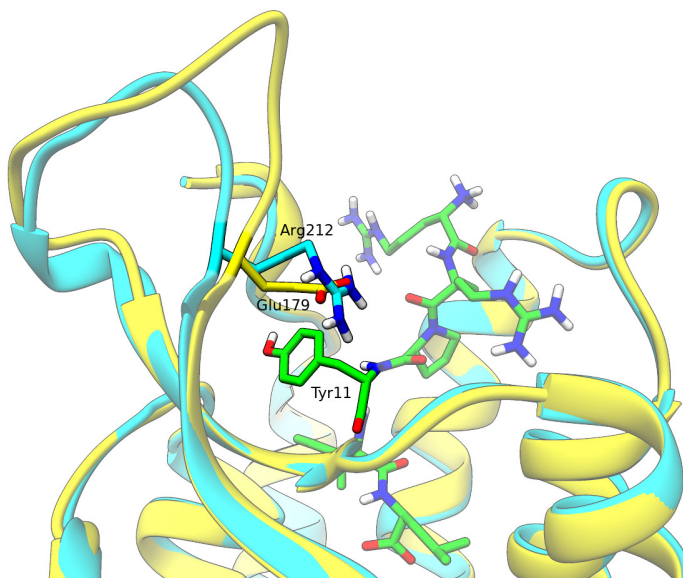


FIGURE 1.26 – Différence entre les sites de liaisons de hNTS1 et hNTS2 exploitée par Fanelli *et al.* (2017). Vert : NT (8-13) ; Jaune : hNTS2 ; Cyan : hNTS1

NTS2 semble globalement plus tolérant aux changements structuraux que NTS1. En particulier, il a été montré à plusieurs reprises que des modifications en position 11 (sur la tyrosine) de NT (8-13) peuvent induire une sélectivité envers NTS2. Ceci a par exemple été accompli grâce à l'introduction, à cette position, de résidus dont la conformation de la chaîne latérale a été contrainte (Simeth *et al.*, 2016; Einsiedel *et al.*, 2008).

Il a aussi été démontré qu'une simple inversion de configuration ou un déplacement de la chaîne latérale sur l'amine α (produisant ainsi un peptoïde) induit une sélectivité envers

B-W	NTS1			NTS2		
	Rat	Humain	Souris	Rat	Humain	Souris
<i>N-ter</i>	Leu55	Leu54	Leu54	Leu23	Leu23	Leu23
3.29	Tyr146	Tyr145	Tyr145	Tyr112	Tyr112	Tyr112
<i>ECL2</i>	Thr226	Thr225	Thr225	Thr195	Thr195	Thr195
6.51	Tyr324	Tyr319	Tyr324	Tyr313	Tyr313	Tyr313
6.54	Arg327	Arg322	Arg327	Arg316	Arg316	Arg316
7.31	Tyr347	Tyr342	Tyr347	Tyr336	Tyr336	Tyr336

Tableau 1.4 – Équivalences des résidus en contact avec NT (8-13) entre les différents sous-types de récepteurs. B-W : numérotation de Ballesteros-Weinstein. Produit à l'aide de <http://www.gpcrdb.org> (Isberg *et al.*, 2015; Pándy-Szekeres *et al.*, 2018).

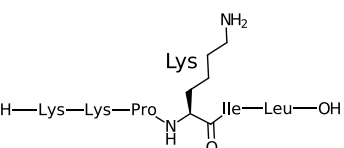
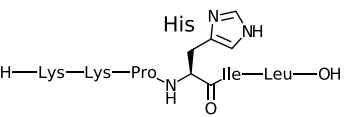
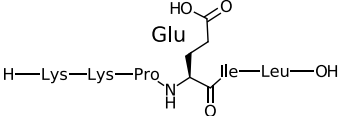
Composé	K _i (nM)		Sélectivité hNTS2/hNTS1
	hNTS1	hNTS2	
	5700	272	21
	456	474	0.96
	> 10 000	1600	nd

Tableau 1.5 – Analogues produits par Fanelli *et al.* (2017)

NTS2 (Schaab *et al.*, 2014). L'augmentation de la taille du groupement aromatique peut aussi rendre sélectifs les analogues dérivés de la NT (8-13).

C'est ainsi que plusieurs composés comportant un analogue de tryptophane à cette position ont été identifiés comme sélectifs (tableau 1.6) (Schaab *et al.*, 2014). Il existe cependant quelques exceptions ; certains analogues de NT (8-13) comportant un résidu apparenté au tryptophane ne sont pas sélectifs (voir section 1.3.2) (Tyler *et al.*, 1999).

Enfin, il est possible d'induire une sélectivité envers NTS2 en exploitant une différence dans les sites de liaisons des deux récepteurs. C'est ce qui a été fait par Fanelli *et al.* (2017). Les auteurs ont remarqué que l'un des acides aminés de la boucle extracellulaire ECL2, faisant partie de l'environnement direct de la tyrosine 11, avait des propriétés opposées dans les deux récepteurs (figure 1.26).

En effet, le résidu arginine 212 (chargé positivement) sur le récepteur NTS1 humain correspond au résidu glutamate 179 (chargé négativement) sur le récepteur NTS2 humain. Les auteurs ont donc postulé que remplacer la tyrosine par un acide aminé chargé négativement devrait induire une interaction défavorable avec NTS1 mais favorable avec NTS2.

Les analogues produits et leurs affinités pour les deux récepteurs sont rapportés dans le tableau 1.5. On voit que l'analogue portant une histidine a une affinité réduite pour les deux récepteurs (456 et 474 nM, respectivement) mais aucune sélectivité.

Le remplacement de la tyrosine par une lysine, en revanche, rend bien le peptide sélectif envers NTS2. Ce dernier a en effet un K_i de 272 nM pour NTS2 et de 5700 nM pour NTS1, soit un ratio de sélectivité de 21.

On aurait pu s'attendre à ce que le remplacement de la tyrosine par un acide aminé chargé négativement acquière une interaction ionique favorable avec l'arginine 212 de NTS1 et défavorable avec le glutamate 179 de NTS2, induisant de ce fait une sélectivité envers NTS1. Le peptide ayant un glutamate à cette position a cependant une très mauvaise affinité pour les deux récepteurs. Les auteurs suggèrent que l'absence d'aromaticité pourrait avoir un effet négatif plus fort sur NTS1 que pour NTS2.

Compd	Sequence	K _i [nm] ^[a]		NTS2 ^[c]		Selectivity Ratio K _i [NTS1]/K _i [NTS2]
		NTS1 ^[b]	[³ H]neurotensin	NTS2 ^[c]	[³ H]NT[8-13]	
NT(8-13) ^[d]		0.24	0.024	1.2	0.17 ^[e]	0.20
22 ^[d]		31 000 ± 7000		8.0 ± 0.94		3900
1a		1700 ± 780 ^[f]		2500 ± 1800 ^[f]		0.68
1b		2500 ± 490 ^[f]		3600 ± 1500 ^[f]		0.69
1c		79 000 ± 21 000		5600 ± 810		14
1d		19 000 ± 2400		5400 ± 2200		3.5
2a		130 ± 36		4.8 ± 1.1		27
2b		52 000 ± 12 000		83 ± 19		630
3		31 000 ± 18 000		520 ± 170		60

Tableau 1.6 – Données d'affinité des dérivés peptidiques **1a-d**, **2a**, **2b** et **3** pour les récepteurs NTS1 et NTS2 humains, en comparaison avec l'agent de référence NT(8-13) et **22**. [a] Les valeurs de K_i en [nm ± SEM] sont les moyennes de 3 à 9 expériences, chacune en triplicata. [b] Membranes de cellules CHO exprimant NTS1 humain de façon stable. [c] Homogénats de cellules HEK 293 exprimant NTS2 humain de façon transitoire. [d] données de Einsiedel *et al.* (2011). [e] valeur de K_D. [f] Les valeurs de K_i en [nM ± SEM] sont les moyennes de deux expériences, chacune en triplicata. Journal : Chemistry OPEN; Authors : Schaab, C ; Kling, R C ; Einsiedel, J ; Hübner, H ; Clark, T ; Seebach, D ; Gmeiner, P ; © 2014 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

1.4 Les macrocycles peptidiques en chimie médicinale

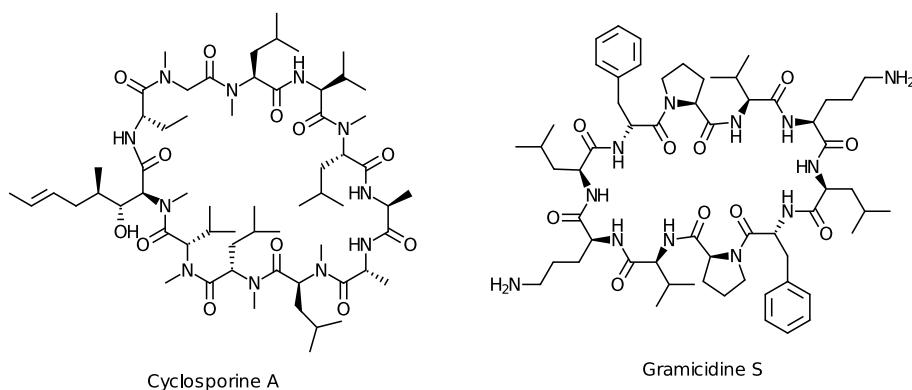


FIGURE 1.27 – Deux exemples de macrocycles naturels utilisés en médecine.

Un macrocycle est défini comme une molécule comportant un cycle de 12 atomes ou plus (Mallinson et Collins, 2012). On les distingue des cycles car ces derniers induisent beaucoup plus de rigidité (Driggers *et al.*, 2008). Il existe de nombreux exemples de peptides macrocycliques naturels. La Gramicidine S (figure 1.27), produite par la bactérie *Bacillus brevis*, est le premier macrocycle peptidique à avoir été utilisé en médecine, pour ses propriétés antibiotiques (Gause et Brazhnikova, 1944). La cyclosporine (figure 1.27) est utilisée depuis longtemps comme immunosupresseur (Wang et Craik, 2016).

Le nombre de publications de chimie médicinale concernant les macrocycles connaît une forte croissance depuis plus d'une décennie (Marsault et Peterson, 2017). La macrocyclisation est en effet reconnue comme une stratégie pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de molécules autant peptidiques que non-peptidiques (Giordanetto et Kihlberg, 2014). Les peptides se prêtent particulièrement à la macrocyclisation puisque cela améliore des propriétés telles que l'absorption et la stabilité, des aspects qui limitent souvent l'utilisation de peptides en pharmacologie.

La macrocyclisation de peptides permet par exemple de favoriser les ponts hydrogènes intramoléculaires, ce qui augmente virtuellement leur caractère lipophile, et donc de faciliter leur diffusion passive à travers la membrane cellulaire (Rezai *et al.*, 2006a). Cette facilitation est influencée par la conformation du peptide, elle-même directement dépendante de la conformation des résidus du peptide (Rezai *et al.*, 2006b), de la nature des chaînes latérales (Rand *et al.*, 2012) et de la *N*-méthylation du lien peptidique (Ovadia *et al.*, 2011; White *et al.*, 2011). Ces considérations ont permis le développement de macrocycles peptidiques présentant une bonne absorption intestinale (et donc une bonne biodisponibilité).

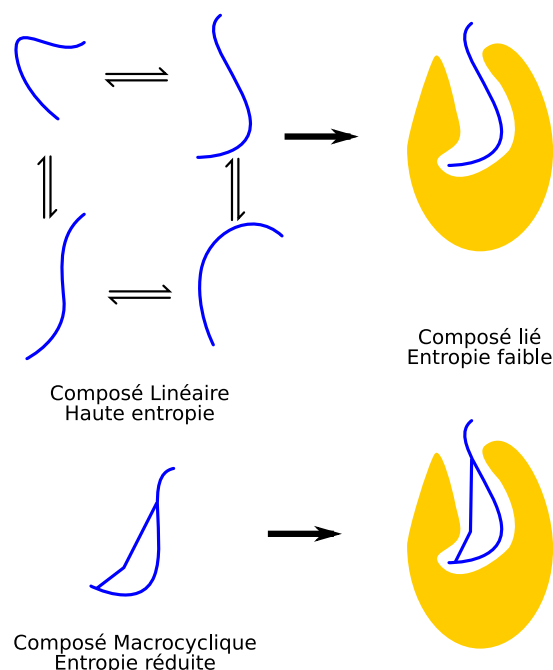


FIGURE 1.28 – Effet de la macrocyclisation sur l'entropie de liaison. Adaptée de Udugamasooriya et Spaller (2008).

(Driggers *et al.*, 2008; Beck *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2017)

Les macrocycles peuvent aussi potentiellement se lier plus aisément à une cible que leurs analogues linéaires (Villar *et al.*, 2014; Glas *et al.*, 2017). Ceci est directement lié à la diminution de la flexibilité, tel qu'illustré dans la figure 1.28. En effet, lorsqu'un ligand linéaire se lie à un récepteur, on a une forte perte d'entropie due à la diminution du nombre de degrés de liberté du ligand au sein de la poche de liaison. Un ligand macrocyclique ayant de base moins de degrés de liberté, la diminution d'entropie sera plus faible, et donc plus favorable (Udugamasooriya et Spaller, 2008). Pour que cette stratégie soit efficace, il est nécessaire que la contrainte macrocyclique induise une conformation proche de celle adoptée par le ligand linéaire au sein de la poche de liaison.

Enfin, la macrocyclisation est utilisée pour maîtriser la structure des peptides, et en particulier leur conférer des structures secondaires de protéines telles que les coudes (figure 1.29A), les hélices α (figure 1.29B), les brins / feuillets β (Brik, 2008) ou même les boucles (Gavenonis *et al.*, 2014). Ceci s'avère particulièrement intéressant pour le développement d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine (Cardote et Ciulli, 2016), ou dans le cas des RCPG peptidergiques, qui ont tendance à reconnaître les coudes β (Tyn-dall *et al.*, 2005; Ruiz-Gómez *et al.*, 2010).

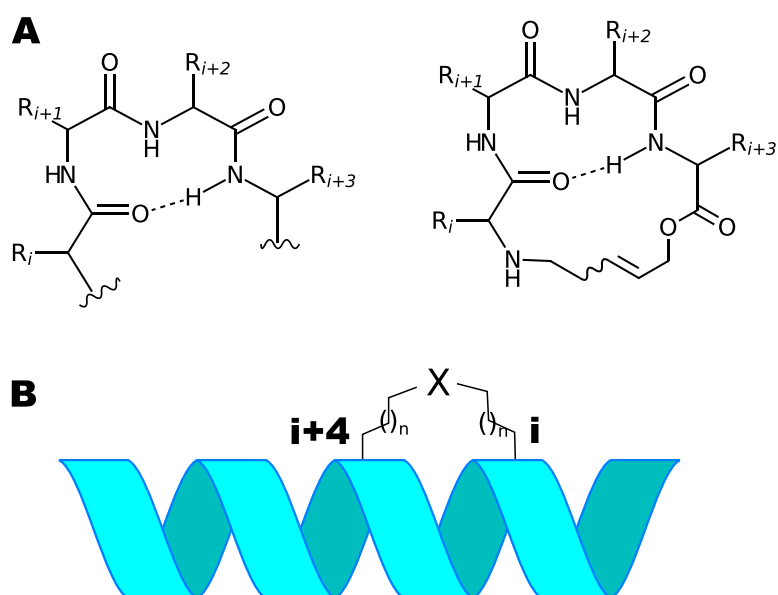


FIGURE 1.29 – Utilisation de macrocycles pour imiter les structures secondaires de protéines. Adaptée de Brik (2008)

1.5 Problématique et hypothèse

La macrocyclisation est une stratégie de chimie médicinale éprouvée pour améliorer à la fois des propriétés pharmacodynamiques (telles que l'affinité et l'activité) et des propriétés pharmacocinétiques (telles que la stabilité et l'absorption). C'est aussi une manière particulière d'étudier la relation conformation-activité de molécules à potentiel pharmaceutique, le défi étant de parvenir à identifier et contrôler la ou les conformations qui induiront les changements recherchés, en synergie les uns avec les autres.

Les peptides se prêtent particulièrement à la macrocyclisation, car leurs propriétés intrinsèques sont souvent à l'opposé de celles que l'on peut leur conférer par la macrocyclisation. Là où les peptides sont flexibles et possèdent énormément de degrés de liberté, les macrocycles peptidiques seront plus contraints. Les peptides sont souvent rapidement dégradés par les protéases, ce qui peut être atténué en empêchant celui-ci d'adopter la conformation correspondant au site actif des protéases.

Notre hypothèse est donc qu'il est possible de macrocycliser la neurotensine (ou plutôt la neurotensine (8-13)), d'une manière qui permette d'améliorer ses propriétés pharmacologiques.

Le premier objectif sera d'identifier un mode de macrocyclisation permettant de conserver l'affinité pour le récepteur NTS1, ainsi que d'augmenter la résistance aux protéases. Pour cela, l'affinité et la stabilité des peptides macrocyclisés par RCM seront évaluées et rationalisées grâce à la modélisation.

Le deuxième objectif sera afin d'effectuer une étude de relation structure-activité en effectuant des changements de structure au niveau des résidus impliqués dans la cyclisation (appelés "chaînon"). Les macrocycles donnant les meilleurs résultats *in vitro* (affinité, activité, stabilité) seront testés *in vivo*.

Enfin, le troisième objectif sera d'évaluer la sélectivité des macrocycles obtenus envers les deux sous-types de RCPG reconnaissant la neurotensine, NTS1 et NTS2 humains, en comparant les affinités.

2 MÉTHODES

2.1 La Cyclisation par Métathèse (RCM)

Il existe de nombreuses méthodes permettant de macrocycliser (Marsault et Peterson, 2011; King et Wagner, 2014; Nguyen *et al.*, 2014; Madsen et Clausen, 2011; White et Yudin, 2011; Marsault et Peterson, 2017). Nous nous intéresserons ici à la cyclisation par métathèse d'oléfines (RCM, pour *Ring Closing Metathesis*), une réaction organométallique qui a valu aux chercheurs Yves Chauvin, Robert H. Grubbs et Richard R. Schrock de recevoir le prix Nobel de Chimie en 2005 (Chauvin, 2006; Grubbs, 2007).

Cette réaction consiste, grâce à un catalyseur métallique, à réarranger les atomes de carbone de groupements alcènes tel que montré dans la figure 2.1 (Hoveyda et Zhugralin, 2007). La carrière de R. H. Grubbs a essentiellement été consacrée au développement des catalyseurs, qui au début comportaient un atome de molybdène ou de tungstène (Grubbs, 2007) mais utilisent aujourd'hui un atome de ruthénium (Queval *et al.*, 2013).

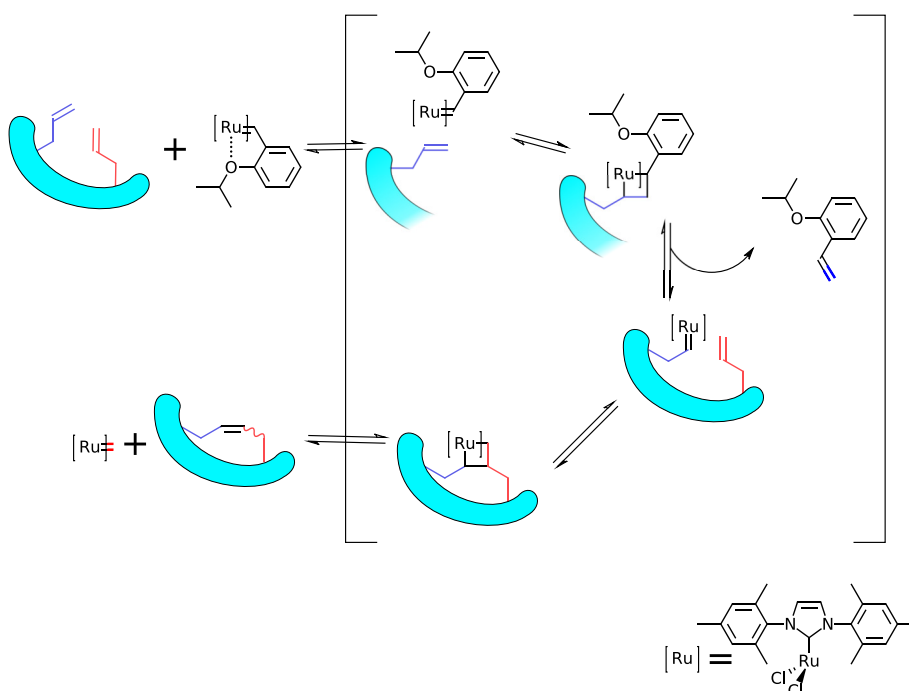


FIGURE 2.1 – Mécanisme de cyclisation par métathèse (RCM)

La RCM est très avantageuse à être utilisée sur les peptides. Celle-ci est en effet compatible avec la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) grâce à la solubilité du catalyseur dans

les solvants organiques tels que le dichlorométhane (Blackwell *et al.*, 2001; Marsault *et al.*, 2006). La RCM est aussi extrêmement sélective et réagit avec des alcènes que l'on ne retrouve pas sur les acides aminés naturels et étant par ailleurs peu réactifs, ce qui permet de s'épargner l'utilisation de groupements protecteurs orthogonaux à la SPPS en stratégie Fmoc. Les alcènes peuvent être introduits sur les peptides par l'utilisation d'acides aminés non naturels, commerciaux ou non.

La littérature de chimie médicinale contient d'ailleurs de nombreux exemples de peptides macrocyclisés dans le but d'imiter les structures secondaires (Blackwell et Grubbs, 1998; Brik, 2008; Pérez de Vega *et al.*, 2010; Elaridi *et al.*, 2006).

2.2 Essais *in vitro*

2.2.1 Quantification de la liaison ligand / récepteur

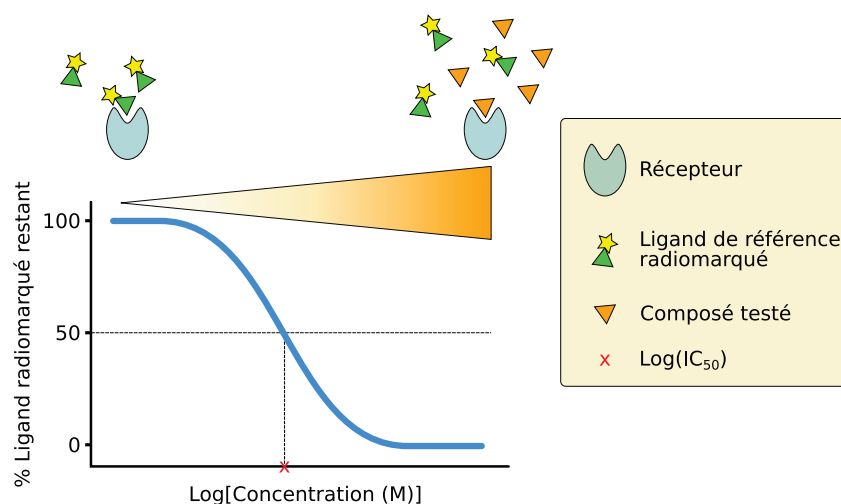
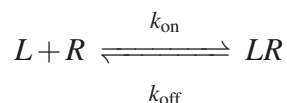


FIGURE 2.2 – Détermination de l'IC₅₀ d'un composé

La rencontre (et donc la liaison) entre un ligand et un récepteur est habituellement décrite par la loi d'action de masse (Hulme et Trevethick, 2010) :



Où k_{on} et k_{off} sont respectivement les constantes d'association et de dissociation à l'équilibre.

Les méthodes de caractérisation de l'affinité reposent le plus souvent sur l'utilisation d'un ligand radiomarqué (généralement avec ^{125}I ou ^3H) (Uddin *et al.*, 2018). On incube des

concentrations croissantes de ce ligand avec le récepteur (obtenu à partir de tissus ou de cellules transfectées) pendant un temps assez long pour obtenir l'équilibre. On filtre ensuite les membranes ou les cellules afin de se débarrasser du ligand non lié et on quantifie le ligand lié au récepteur à l'aide d'un compteur de radioactivité. Si les concentrations maximales utilisées sont suffisamment grandes pour saturer le récepteur, on peut tracer une courbe de saturation, on peut déterminer la concentration de ligand pour laquelle la moitié des récepteurs sont occupés (Bylund et Toews, 1993). Cette valeur correspond à la constante de dissociation K_d , qui est directement reliée aux constantes k_{on} et k_{off} :

$$K_d = \frac{[L][R]}{[LR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Il serait cependant fastidieux de radiomarquer chaque ligand que l'on souhaite caractériser. Il est donc plus commun d'obtenir une courbe de déplacement (compétitif, figure 2.2), avec une concentration constante de ligand de référence radiomarqué et des concentrations croissantes de ligand étudié (McKinney et Raddatz, 2006). On détermine alors la concentration de ligand étudié qui déplace la moitié du ligand radiomarqué (IC_{50}) ou l'affinité (K_i). Ces deux valeurs sont reliées entre elles par l'équation de Cheng-Prusoff (Cheng et Prusoff, 1973; Hulme et Trevethick, 2010) :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_d^*}}$$

Où $[L^*]$ et K_d^* sont respectivement la concentration et la constante de dissociation du ligand radiomarqué.

2.2.2 Quantification de l'association/dissociation de protéines

Le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET, pour *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) est un phénomène exploité en biochimie pour observer la dissociation ou l'association de protéines. Il consiste en la production de bioluminescence via l'association d'un couple de protéines. Celles-ci sont issues d'organismes produisant de la bioluminescence, tels les lucioles, ou bien l'espèce de pensée de mer *Renilla reniformis*. Cette dernière exprime deux protéines, d'un côté une enzyme, la *Renilla Luciferase* (Rluc), qui est capable d'émettre une lumière ayant un pic d'émission à 480 nm lorsqu'elle oxyde la molécule organique luciférase en présence d'oxygène, d'un autre côté la *Green Fluorescent Protein* (GFP), qui est capable d'absorber cette énergie et d'émettre à son tour une lumière ayant un pic d'émission à 520 nm (Marullo et Bouvier, 2007) Ceci

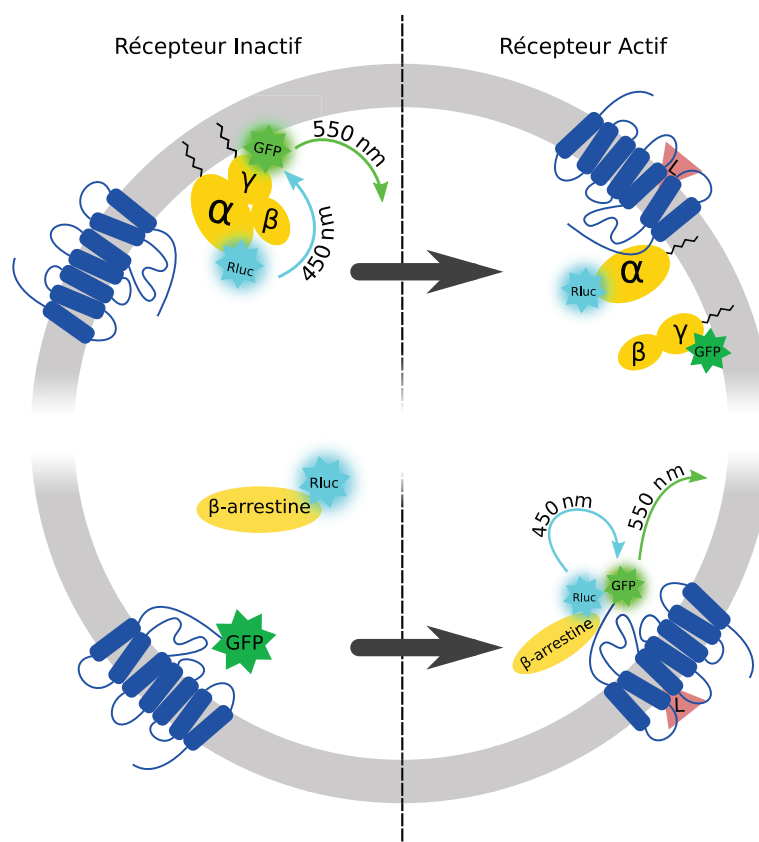


FIGURE 2.3 – La technique de BRET pour observer la dissociation des protéines G (en haut) ou l’association du récepteur avec la β -arrestine (en bas).

est du au fait que le spectre d’émission du donneur (Rluc) et le spectre d’absorption de l’accepteur (GFP) se recouvrent partiellement.

Ce transfert d’énergie ne peut avoir lieu que lorsque les deux protéines sont à proximité l’une de l’autre. Expérimentalement, mesurer l’émission de la GFP permet donc de quantifier l’association de ces protéines (Hamdan *et al.*, 2006).

Afin d’appliquer ceci à l’observation de l’association/dissociation de protéines d’intérêt, on fait exprimer à des cellules les dites protéines, fusionnées à la Rluc et à la GFP. Dans le cas des RCPG, on peut transfecter des cellules avec la Rluc fusionnée à la sous-unité α de la protéine G, et la GFP fusionnée à la sous-unité γ (voir figure 2.3, en haut). Ainsi, lorsque l’on incubera les cellules avec un ligand activant le RCPG d’intérêt (lui aussi transfecté de manière transitoire), on observera une diminution de l’intensité du signal de la GFP (dans les faits, on fait le ratio d’émission des deux protéines, afin de normaliser le signal).

On s’affranchit ainsi d’essais de mesure de la concentration de seconds messagers, qui peuvent être très différents selon les protéines G activées.

La même technique peut être appliquée à des voies de signalisation indépendantes des protéines G, telles que l'association de la β -arrestine au récepteur. Pour cela, les protéines transfectées sont le récepteur fusionné à la GFP (en C-terminal, puisque l'association se déroule dans le cytoplasme) et la β -arrestine fusionnée à la GFP (voir figure 2.3, en bas).

2.3 Essais *in vivo*

2.3.1 *Modèle de douleur aigüe*

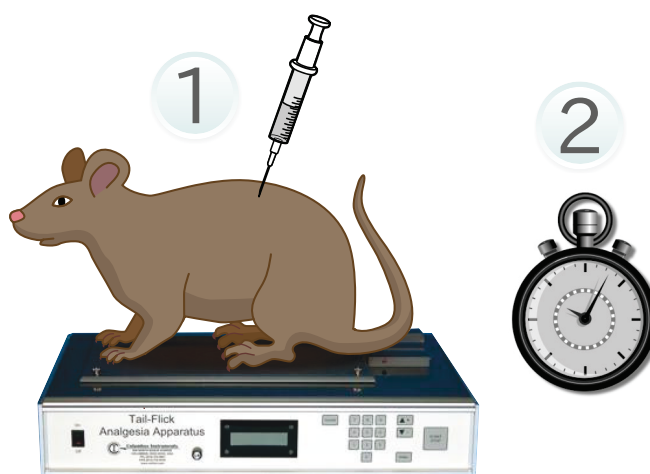


FIGURE 2.4 – Mesure du temps de réponse à un stimuli douloureux aigü suite à l'injection intrathécale d'un composé à évaluer.

Le test du retrait de la queue (*tail-flick test*) est un modèle de douleur aigüe reconnu pour être prédictif de l'activité des analgésiques (notamment des opioïdes) chez l'humain (Archer et Harris, 1965). Il consiste à mesurer le temps de réaction à un stimuli thermique (chaleur induite par un laser ou par immersion dans de l'eau chaude) au niveau de la queue de rats (figure 2.4). Un composé analgésique aura évidemment pour effet d'augmenter ce temps de réaction (Le Bars *et al.*, 2001).

2.3.2 *Modèle de douleur inflammatoire*

Le test à la formaline est un modèle de douleur inflammatoire. Il consiste à injecter de la formaline dans la patte d'un rongeur, puis à évaluer sa réponse à la douleur selon un barème pré-établi. Toutes les 3 minutes pendant une heure on accordera donc un score de 0 si l'animal pose sa patte au sol fermement en y laissant reposer son poids, sans différence avec la patte non injectée, de 1 si la patte est légèrement relevée et que l'animal boite, de 2 si l'animal ne repose pas sa patte sur le sol et de 3 si l'animal lèche, secoue ou mordille sa patte (Dubuisson et Dennis, 1977). Sans analgésie, on observe typiquement une courbe

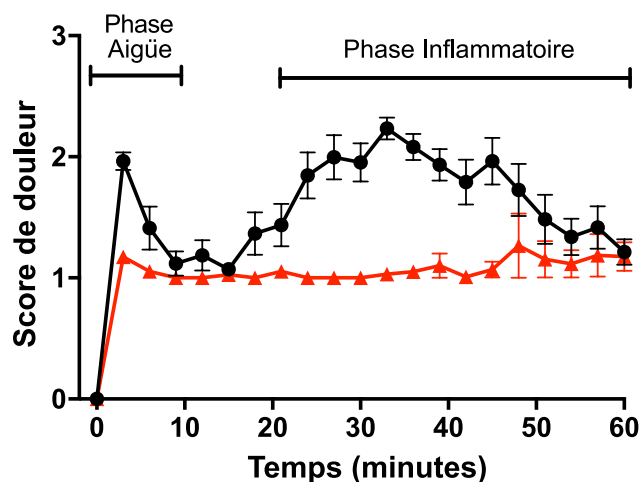


FIGURE 2.5 – Exemple de courbe obtenue avec le modèle de douleur inflammatoire

telle que la courbe noire sur la figure 2.5. Cette courbe comporte deux phases, une phase aigüe (5-10 minutes) suivie d'une phase inflammatoire (10-60 minutes) (Tjølsen *et al.*, 1992). Un composé analgésique (courbe rouge) fera diminuer le score de douleur.

Ce test est considéré plus représentatif d'une douleur qui nécessiterait un traitement que les tests de douleur réflexes tels que le test de retrait de la queue (Hole et Tjølsen, 1993; Coderre, 1993).

2.3.3 Modélisation et amarrage moléculaire

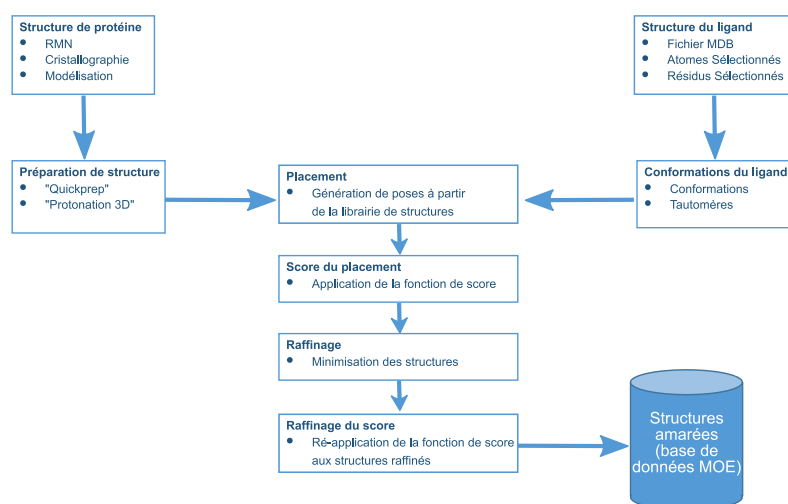


FIGURE 2.6 – Méthode de travail pour l'amarrage moléculaire des macrocycles avec le programme Molecular Operating environment (MOE) (ChemCompGroup, 2018)

Les études de modélisation ont été effectuées avec le logiciel MOE (Molecular Operating environment) (ChemCompGroup, 2018). Le procédé d'amarrage moléculaire est décrit par la figure 2.6. La structure du récepteur doit être importée à partir de données expérimentales obtenues par RMN ou cristallographie, ou encore à partir d'un modèle d'homologie. Cette structure doit être corrigée pour ajouter les résidus ou atomes absents de la structure, puis protonée. Cette préparation est effectuée automatiquement par MOE.

Les conformations du ligand étant inconnues, elles sont calculées par MOE. Le logiciel des rotations aléatoires des liens covalents puis calcule l'énergie de la conformation obtenue en se basant sur le champ de force Amber12 (Case *et al.*, 2012). L'énergie de chaque nouvelle conformation est comparée à celle des précédentes. Si elle est supérieure à celle des conformations déjà obtenues, elle est rejetée, tandis que si elle y est inférieure, elle est enregistrée. Lorsque l'énergie des nouvelles conformations ne diminue plus, le calcul prend fin et les conformations obtenues sont utilisées pour l'amarrage.

Le logiciel place ensuite les conformations dans le site de liaison et calcule un score à l'aide de la fonction GBVI/WSA dG (pour "*Generalized-Born Volume Integral/Weighted Surface area*") (Corbeil *et al.*, 2012). Cette fonction calcule un score en fonction des interactions (électrostatiques et de Van der Waals) entre le ligand et le récepteur. Les conformations ayant le meilleur score sont "raffinées" c'est-à-dire que le logiciel diminue l'énergie du système (encore une fois en se basant sur le champ de force Amber12) en optimisant les positions des atomes du ligand et des résidus du site de liaison. Ce procédé est appelé "minimisation". Le score des conformations ainsi minimisées est à nouveau calculé et les 10 meilleures sont enregistrées.

3 PREMIER ARTICLE

In search of the optimal macrocyclization sites for neurotensin.

Auteurs de l'article: Marc Sousbie, Élie Besserer-Offroy, Rebecca L. Brouillette, Jean-Michel Longpré, Richard Leduc, Philippe Sarret and Éric Marsault.

Statut de l'article: Publié dans ACS Medicinal Chemistry Letters

Avant-propos: J'ai contribué à cet article en faisant la synthèse de tous les composés présentés. J'ai conçu la première génération de macrocycle en utilisant la littérature existante. Pour la conception des générations subséquentes, j'ai appris et utilisé les techniques de modélisation décrites ici (création d'un modèle d'homologie, superposition et amarrage moléculaire des macrocycles). Les essais pharmacologiques à l'exception des expériences de BRET (c'est-à-dire les essais d'affinité et de stabilité) ont été effectuées par moi-même. J'ai produit l'essentiel des figures et du manuscrit.

Résumé: En partant du principe que la macrocyclisation permet souvent d'améliorer les propriétés de composés linéaires (notamment les peptides) telles que l'affinité et la stabilité, nous avons décidé de rechercher la meilleure façon de cycliser la neurotensine.

Au début de ce projet, les études de relation structure-activité disponibles dans la littérature indiquaient que le peptide NT (8-13), constitué des six acides aminés C-terminaux de la NT retient toute l'activité du peptide entier. C'est donc à partir de ce peptide de six acides aminés que la plupart des analogues de la neurotensine sont développés. Au-delà de ce fait, relativement peu d'informations structurales étaient disponibles lorsque cette recherche a commencé. Il s'est donc avéré difficile d'imaginer la conformation adoptée par le peptide au sein de la poche de liaison du récepteur. Tous les macrocycles de première génération avaient donc une très mauvaise affinité pour NTS1. La publication de la structure par rayons X du récepteur NTS1 lié à la NT (8-13) a permis de rationaliser la conception des macrocycles. Ainsi, grâce à la modélisation et plusieurs essais-erreurs, un macrocycle ayant une meilleure affinité pour NTS1 que son équivalent linéaire a été produit.

Ce macrocycle est aussi capable d'activer le récepteur et constitue le modèle de base (ou prototype) des macrocycles produits dans l'article suivant.

Abstract : Neurotensin exerts potent analgesic effects following activation of its cognate GPCRs. In this study, we describe a systematic exploration, using structure-based design, of conformationally constraining neurotensin (8-13) with the help of macrocyclization and the resulting impacts on binding affinity, signaling and proteolytic stability. This exploratory study led to a macrocyclic scaffold with sub-micromolar binding affinity, agonist activity and greatly improved plasma stability.

Neurotensin (NT) is a 13-residue peptide *N*-terminally pyroglutamylated (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) which was discovered in 1973 by Carraway *et al.*¹ It acts as a neurotransmitter and neuromodulator in the central nervous system via two G-protein coupled receptors (GPCRs), NTS1 and NTS2. NTS1 is coupled to several G protein pathways including the $G_{\alpha q}$ pathway² and acts as a hormone receptor in the gastrointestinal tract and endothelial cells.^{3,4} Both receptors, when activated by NT, induce a potent analgesic effect,^{5,6} similar to opioids but independently of the opioid receptors.^{7,8}

The neurotensinergic system has been studied to a large extent for its potential in the treatment of pain, and as a result many analogues have been produced to better understand and improve upon the properties of NT.

Structure/activity relationship studies on NT revealed that its C-terminal hexapeptide, NT (8-13), retains all the activity of the full-length peptide.^{9,10} This shorter peptide has therefore been the starting structure of choice for most studies targeting neurotensin receptors.⁴

However, NT (8-13) displays the characteristics that often limit the use of peptides as drugs, namely short *in vivo* half-life and poor oral bioavailability. Modifications to NT in the form of linear analogs with improved stability and excellent binding affinities have been reported. More specifically, replacement of L-residues by their D-isomers,¹¹ reduction of amide bonds,¹² *N*-methylation or the use of unnatural amino acids,^{13,14} proved to be beneficial when introduced at specific positions in the peptide.

Macrocyclization is a field-tested approach to protect peptides against proteolytic degradation,^{15–18} and has been exploited to successfully improve the pharmacological properties of several peptides.¹⁹ In addition to increased proteolytic stability, macrocyclization allows control over peptides conformation²⁰ and fine-tuning of their structural properties, in addition to providing insights on the receptor's tolerance to ligand conformational changes. To date, only a handful of studies have been reported on the implementation of macrocyclization on NT.^{21,22} Interestingly, head-to-tail cyclization of NT (8-13) resulted in analogs which display central physiological effects when injected intravenously.^{23,24}

At the outset of this study aimed at identifying suitable sites for macrocyclization on NT, there was evidence that several peptidergic GPCRs recognized turn structures.^{25,26} In addition, several structural studies based on solution NMR and solid-state NMR, molecular modelling and mutagenesis suggested that NT was no exception to this rule.^{27–28} At that

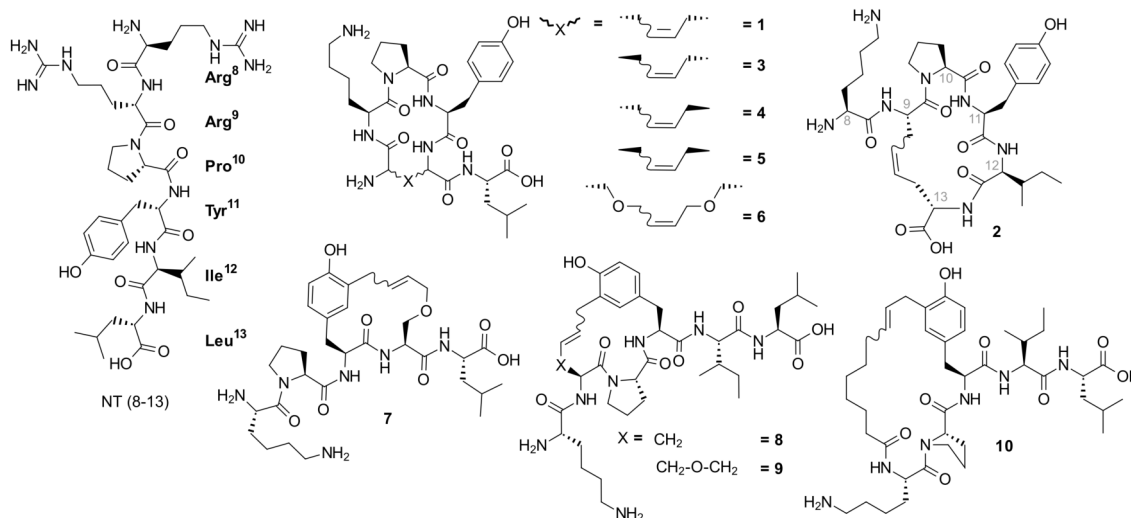


FIGURE 3.1 – Structures of the macrocyclic analogues explored in this study. Gray numbers : NT nomenclature.

time, the X-ray structure of NTS1 had not been published.

We chose to constrain NT (8-13) via macrocyclization using Ring-Closing Metathesis (RCM). RCM has been widely used to induce turn structure on peptides,²⁹ and is particularly suited because of its high tolerance to diversified functional groups.^{30,31} The required allyl groups are easily integrated into peptides on solid phase (using Fmoc strategy on 2-chlorotrityl chloride resin), usually with the help of commercially available unnatural amino acids such as allylglycine. The macrocyclization reaction can be carried out directly on solid support (Scheme 3.2). Benzoquinone is added along with the catalyst to prevent alkene isomerization³² and the RCM reaction often benefits from microwave irradiation.³³ After simultaneous cleavage of the peptide from the resin and deprotection of the lateral chains under acidic conditions, purification on preparative LC-MS allowed isolation of the desired macrocycle.

Since NT (8-13) is a short peptide, folding it into a turn implies linking the lateral chains of residues situated on both extremities (C- and N-termini). Regardless of the impact on conformation, replacing Ile¹² or Leu¹³ by allylglycine is only a minor structural change from a steric standpoint, and removing one of the side chains of Arg⁸ or Arg⁹ has been reported to have a relatively low impact on NTS1-binding affinity.⁸ Additionally, replacement of Arg by Lys at positions 8 and 9 has only very limited impact on binding and signaling.³⁴

These considerations led to the design and synthesis of macrocycles **1** and **2** (Figure 3.1).

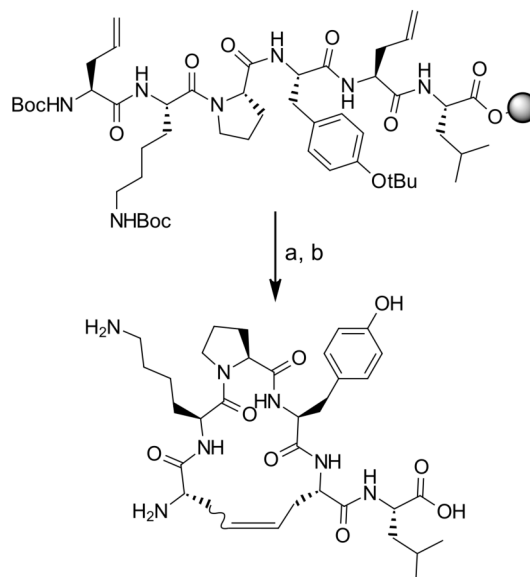


FIGURE 3.2 – Macrocyclization reaction. Reagents and conditions : (a) Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst, benzoquinone, DCE, 50°C, microwave, 1h; (b) TFA/DCM/TIS, 1h.

They both form 17-membered rings, however **1** is cyclized between positions 8 and 12 whereas **2** is cyclized between positions 9 and 13. As a result, **1** bears a C-terminal exocyclic Leu whereas **2** bears an N-terminal exocyclic Lys residue.

The ability of these compounds to bind the NTS1 receptor was determined using a competitive ligand binding assay. Briefly, increasing concentrations of the compounds were incubated with a constant amount of ¹²⁵I-[Tyr³]NT and NTS1-expressing cell membranes. After filtration, NTS1-bound radioactivity was quantified using a γ -counter and IC₅₀ values determined are reported in Table 3.1.

First, although both compounds have low affinity, compound **1** seems to be preferred (IC₅₀ 17 vs >100 μ M). However, its linear precursor possesses 10-fold higher affinity than its macrocyclic counterpart (table 3.1, entry **1-L**, IC₅₀ 1.7 μ M). This clearly shows that the conformational changes induced by this macrocyclization position alter receptor recognition. This also indicates that simultaneous replacement of Arg⁸ and Ile¹² by allylglycine impairs binding.

Macrocycles **3-5** were then produced using D-allylglycine in N-terminal (**3**), C-terminal (**4**) or at both positions (**5**) as an attempt to elucidate whether these changes in stereochemistry would impact binding.

Although macrocycle **3** shows minor improvement over macrocycle **1** (IC₅₀ 10 μ M vs 17

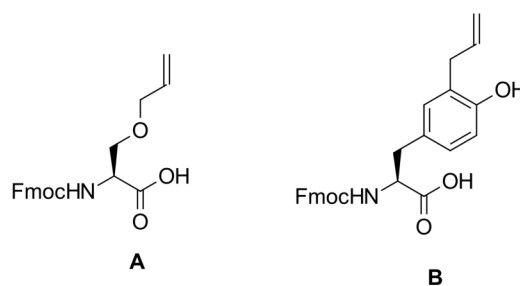


FIGURE 3.3 – Custom linkers A and B

Code	Sequence	IC ₅₀ (μM) ± SEM
NT (8-13)	RRPYIL	0.0008 ± 0.0003
1	[All-KPY-All]L	17 ± 4
1-L^b	All-KPY-All-L	1.7 ± 0.5
2	K[All-PYI-All]	> 100
3	[D-All-KPY-All]L	10 ± 1.6
4	[All-KPY-D-All]-L	14.3 ± 10.0
5	[D-All-KPY-D-All]-L	19.8 ± 4.9
6	[S(All)PYS(All)]L	> 100
7	KP[Y(All)S(All)L]	29.8 ± 4.0
8	K[All-PY-All]IL	7.6 ± 2.9
9	K[S(All)PY(All)]IL	10.3 ± 2.6
10	[NonKPY(All)]IL	0.4 ± 0.2
10-L^b	NonKPY(All)IL	1.4 ± 0.6

Tableau 3.1 – Binding affinities. IC₅₀ values were determined as described in the Materials and Methods section. Measurements were performed in triplicate and represent the means ± standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. ^bLinear precursors of compounds **1** and **10**. All : allylGlycine ; Non : nonenoyl.

μM, respectively), it remains marginal compared to the reference peptide NT (8-13) (IC₅₀ 0.8 nM). Since these macrocycles seemed to be deleterious for binding affinity, we decided to increase the length of the side-chain linker, which was expected theoretically to make the resulting macrocycles more flexible to adapt to the binding pocket.

To accomplish this, we synthesized linker A (Figure 3.3) by alkylating the lateral chain of Boc-Ser-OH with allyl bromide³⁵ followed by Boc deprotection and subsequent Fmoc protection of the α-amine. This linker was then used during solid phase peptide synthesis to produce the 21-membered macrocycle **6**, which possesses lower affinity for NTS1 than its smaller, more constrained congeners.

In 2012, White and co-workers reported the X-ray structure of the rat NTS1 receptor (PDB ID 4grv).³⁶ Remarkably, this was the first time that the structure of a GPCR was

obtained by co-crystallizing with a peptidergic agonist, in this case the unmodified ligand NT (8-13). This allowed us to assess the previous results in a new context. Essentially, the newly reported structure demonstrated that the peptide NT (8-13) actually adopts a linear conformation inside the binding pocket, which was congruent with several structural studies on neurotensin.^{9,37–40}

This perspective granted us with the opportunity to get an in-depth understanding of the first-generation of macrocycles, and support the design of new improved analogues using the Molecular Operating Environment (MOE) package,⁴¹ which was instrumental to superimpose macrocycles **1**, **2** and **6** to the receptor-bound conformation of NT (8-13) (Figure 3.4, A, B, C, respectively). Toward this end, the macrocycle underwent a flexible alignment onto the fixed NT (8-13) structure to get the best possible fit of the features of both structures. It showed, as expected, that **1** and **2** adopted a turn structure that is too compact in comparison with the bound linear peptide, and although **6** displayed improved structural overlap, the added linkers are likely too bulky and would not fit into the receptor's pocket, possibly because of unfavorable interactions with Asn¹²⁷ or His¹³².

In light of the above, it became apparent that the design of a linear-shaped, low steric bulk macrocycle implied that the extremities could not be bound together, be it by a short or a long linker. On such a short peptide, new options appeared in the form of side-chain-to-*C*-terminal or side-chain-to-*N*-terminal macrocyclization.

Knowing that existing SAR on NT (8-13) had demonstrated that an aromatic residue is vital in position 11 in order to bind to NTS1, the replacement of Tyr by a linker such as allylglycine or serine(O-allyl) was therefore not a viable avenue.^{9,27,34,40,42}

To overcome this, ortho-allylated tyrosine linker B (Figure 3.3) was synthesized via a Claisen rearrangement of the commercially available Fmoc-Tyr(O-allyl)-OH in the presence of diethylaluminum chloride as a Lewis acid⁴⁴. To prevent an unfavorable interaction of the free phenol group with the ruthenium catalyst during the RCM step, which would decrease macrocyclization yield,⁴⁵ phenol was acetylated immediately prior to the RCM. The acetyl group was removed before the final deprotection step by treatment with piperidine similar to Fmoc deprotection.

Using this strategy, macrocycle **7**, **8** and **9** were produced, featuring side-chain-to-*C*-terminal link between Tyr¹¹ and linker A in position 12 and side-chain-to-*N*-terminal link between Tyr¹¹ and allylGly or linker A in position 9, respectively. In addition to affinity measurements, we used molecular modelling to dock these compounds into a homology model of human NTS1 based on the crystal structure of rat NTS1.

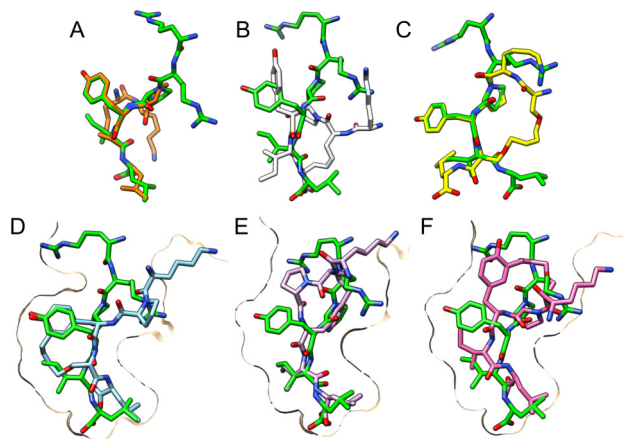


FIGURE 3.4 – Top row : Macrocycles **1**, **2** and **6** (A, B and C, respectively) aligned with the conformation of NT (8-13) within the crystal structure of NTS1 (green); Bottom row : Macrocycles **7**, **8** and **9** (D, E and F, respectively) docked into NTS1. NT (8-13) (green) is shown for comparison. Molecular graphics were performed with the UCSF Chimera package.⁴³

Although docking results (Figure 3.4, bottom row) indicate a good overlap with the reference peptide, the measured affinities of these compounds are still very low (7.6 – 29.8 μM). Taken together, these results show that the receptor is rather intolerant to minor changes in the ligand's conformation in the core of the binding pocket.

Closer examination of the structure of NT (8-13) in the binding pocket of NTS1 revealed a certain proximity between residues Tyr¹¹ and Arg⁸ (7.4 Å) as well as the same orientation with an apparently empty space between them (Figure 3.5A). In order to exploit this feature, macrocycle **10** was designed, where Arg⁸ was replaced with nonenoic acid, which possesses the appropriate length to reach the Tyr¹¹. This compound gave very promising docking results (Figure 3.4B and C) and turned out to be the best binding macrocycle of this series with an IC₅₀ of 0.4 μM . Interestingly, **10** possesses a 3-fold improved affinity compared to its linear precursor (**10-L**, IC₅₀ 1.4 μM), which suggests that the conformational constraint imposed by cyclization favorably impacts interaction with the receptor. Supplementary Figure 3.7 shows that **10** is involved in fewer interactions with the receptor than NT (8-13) is.

The ability of **10** to activate the receptor was confirmed using BRET-based biosensors assay to measure activation of the G $_{\alpha q}$ pathway and the recruitment of β -arrestin 2 (see Supplementary Figure 3.8). Indeed, compound **10** was able to induce full G $_{\alpha q}$ activation (EC₅₀ 166.3 nM) and to stimulate β -arrestin 2 recruitment at NTS1 (EC₅₀ 1370 nM).

Furthermore, the sensitivity of **10** to proteolytic degradation was assessed by incubation

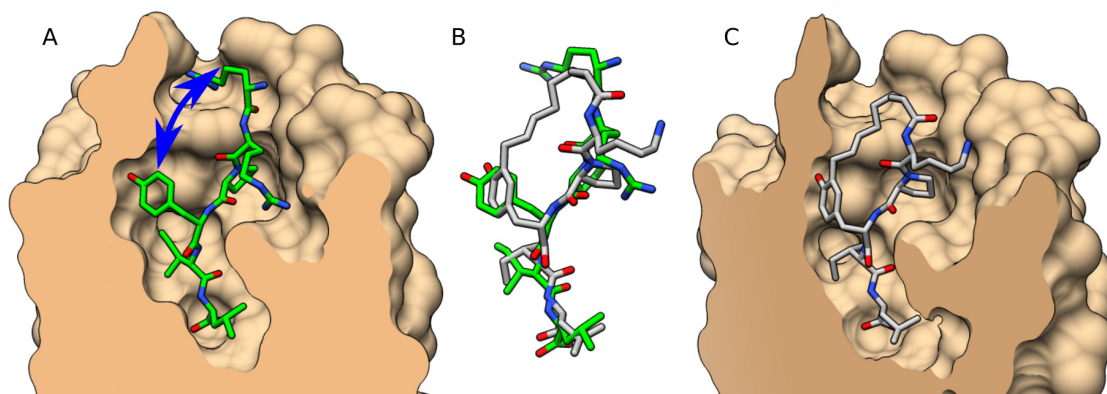


FIGURE 3.5 – Comparison of the crystallized NT (8-13) conformation with **10**. A NTS1 crystal. Blue arrow indicates available space between Tyr¹¹ and Arg⁸. B Superimposition of NT (8-13) from the crystal and macrocycle **10** (docked). C Macrocycle **10** docked into an homology model of human NTS1 based on the crystal. Molecular graphics were performed with the UCSF Chimera package.⁴³

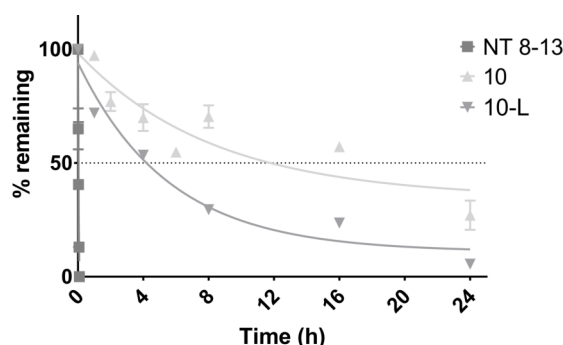


FIGURE 3.6 – Plasma stability of **10** compared to NT (8-13).

with rat plasma followed by UPLC-MS quantification (see Supplementary Information for full experimental procedures). Under these conditions, **10** possessed a half-life of 12 hours, which is far superior to NT (8-13) which possesses a half-life around 3 minutes (Figure 3.6). Such extended stability is a significant advantage of these compounds as pharmacological tools. Further work is under way to decipher the SAR of this new lead series and use it to better understand the pharmacology of the neurotensinergic system.

In conclusion, we identified a novel macrocyclic scaffold which possesses good binding affinity for the NTS1 receptor, behaves as a full agonist, and displays excellent in vitro stability. We believe macrocycle **10** is a promising starting point for the development of new neurotensin macrocyclic analogues. Subsequent analogues in this series will be reported in due course.

3.1 References

- (1) Carraway, R. ; Leeman, S. E. ; The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248 (19), 6854–6861.
- (2) Besserer-Offroy, É. ; Brouillette, R. L. ; Lavenus, S. ; Froehlich, U. ; Brumwell, A. ; Murza, A. ; Longpré, J. M. ; Marsault, É. ; Grandbois, M. ; Sarret, P. ; Leduc, R. ; The signaling signature of the neurotensin type 1 receptor with endogenous ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, 805 (January), 1–13.
- (3) Vincent, J. P. ; Mazella, J. ; Kitabgi, P. ; Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 20 (7), 302–309.
- (4) Patrycja, P. K. ; Lipkowski, A. W. ; Neurotensin and neurotensin receptors : characteristic, structure-activity relationship and pain modulation -A review. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 1–7.
- (5) Roussy, G. ; Dansereau, M.-A. ; Doré-Savard, L. ; Belleville, K. ; Beaudet, N. ; Richelson, E. ; Sarret, P. J. ; Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *Neurochem.* **2008**, 105 (4), 1100–1114.
- (6) Tétreault, P. ; Beaudet, N. ; Perron, A. ; Belleville, K. ; René, A. ; Cavelier, F. ; Martinez, J. ; Stroh, T. ; Jacobi, A. M. ; Rose, S. D. ; Behlke, M. A. ; Sarret, P. ; Spinal NTS2 receptor activation reverses signs of neuropathic pain. *FASEB J.* **2013**, 27 (9), 3741–3752.
- (7) Clineschmidt, B. V. ; McGuffin, J. C. ; Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* **1977**, 46 (4), 395–396.
- (8) Clineschmidt, B. V. ; McGuffin, J. C. ; Bunting, P. B. ; Neurotensin : Antinocisponsive action in rodents *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, 54 (1–2), 129–139.
- (9) Barroso, S. ; Richard, F. ; Nicolas-Ethève, D. ; Reversat, J. L. ; Bernassau, J. M. ; Kitabgi, P. ; Labbé-Jullié, C. ; Identification of residues involved in neurotensin binding and modeling of the agonist binding site in neurotensin receptor 1. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (1), 328–336.
- (10) Glimcher, P. W. ; Margolin, D. H. ; Giovino, a a ; Hoebel, B. G. ; Neurotensin : a new 'reward peptide'. *Brain Res.* **1984**, 291 (1), 119–124.
- (11) Checler, F. ; Vincent, J. P. ; Kitabgi, P. ; Neurotensin analogs [D-TYR11] and [D-PHE11]neurotensin resist degradation by brain peptidases in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1983**, 227 (3), 743–748.
- (12) Wustrow, D. J. ; Davis, M. D. ; Akunne, H. C. ; Corbin, A. E. ; Wiley, J. N. ; Wise, L. D. ; Heffner, T. G. ; Reduced amide bond neurotensin 8–13 mimetics with potent in vivo activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5 (9), 997–1002.
- (13) Smith, K. E. ; Boules, M. ; Williams, K. ; Richelson, E. ; NTS1 and NTS2 mediate

analgesia following neurotensin analog treatment in a mouse model for visceral pain. *Behav. Brain Res.* **2012**, 232 (1), 93–97.

(14) Fanelli, R.; Besserer-Offroy, É.; René, A.; Côté, J.; Tétreault, P.; Colletette-Tremblay, J.; Longpré, J.-M.; Leduc, R.; Martinez, J.; Sarret, P.; Cavelier, F.; Synthesis and Characterization in Vitro and in Vivo of (l)-(Trimethylsilyl)alanine Containing Neurotensin Analogues. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (19), 7785–7795.

(15) Marsault, É.; Peterson, M. L. Practical Medicinal Chemistry with Macrocycles : Design, Synthesis, and Case Studies; Marsault, É., Peterson, M. L., Eds.; Wiley, **2017**.

(16) Marsault, E.; Peterson, M. L.; Macrocycles are great cycles : applications, opportunities, and challenges of synthetic macrocycles in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (7), 1961–2004.

(17) Yudin, A. K.; Macrocycles : lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (1), 30–49.

(18) Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K.; The exploration of macrocycles for drug discovery—an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (7), 608–624.

(19) Beck, J. G.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kiran, M. U.; Frank, A. O.; Neubauer, S.; Ovadia, O.; Greenberg, S.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H.; Intestinal permeability of cyclic peptides : common key backbone motifs identified. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (29), 12125–12133.

(20) Glas, A.; Wamhoff, E.-C.; Krüger, D. M.; Rademacher, C.; Grossmann, T. N.; Increased Conformational Flexibility of a Macrocycle-Receptor Complex Contributes to Reduced Dissociation Rates. *Chemistry* **2017**, 23 (64), 16157–16161.

(21) Akunne, H. C.; Darling, S.; Zoski, K.; Seftler, a M.; He, J. X.; Sawyer, T. K.; Pug-sley, T. a; Cody, W. L.; Functional activity of new C-terminal cyclic-neurotensin fragment analogs. *Neuropeptides* **1996**, 30 (3), 213–218.

(22) Lundquist, J. T.; Dix, T. A.; Preparation and receptor binding affinities of cyclic C-terminal neurotensin (8-13) and (9-13) analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9 (17), 2579–2582.

(23) Van Kemmel, F. M.; Dubuc, I.; Bourdel, E.; Fehrentz, J. a; Martinez, J.; Costentin, J.; A C-terminal cyclic 8-13 neurotensin fragment analog appears less exposed to nepri-lysin when it crosses the blood-brain barrier than the cerebrospinal fluid-brain barrier in mice. *Neurosci. Lett.* **1996**, 217 (1), 58–60.

(24) Bredeloux, P.; Cavelier, F.; Dubuc, I.; Vivet, B.; Costentin, J.; Martinez, J.; Synthesis and biological effects of c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (JMV2012), a new analogue of neurotensin that crosses the blood-brain barrier. *J. Med. Chem.* **2008**,

51 (6), 1610–1616.

(25) Tyndall, J. D. a; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P.; Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chem. Rev.* **2005**, 105 (3), 793–826.

(26) Ruiz-Gómez, G.; Tyndall, J. D. a; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P.; Update 1 of : Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (4), PR1-41.

(27) Pang, Y. P.; Cusack, B.; Groshan, K.; Richelson, E.; Proposed ligand binding site of the transmembrane receptor for neurotensin(8-13). *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (25), 15060–15068.

(28) Luca, S.; White, J. F.; Sohal, A. K.; Filippov, D. V; van Boom, J. H.; Grisshammer, R.; Baldus, M.; The conformation of neurotensin bound to its G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100 (19), 10706–10711.

(29) Blackwell, H. E.; Sadowsky, J. D.; Howard, R. J.; Sampson, J. N.; Chao, J. A.; Steinmetz, W. E.; O’Leary, D. J.; Grubbs, R. H.; Ring-closing metathesis of olefinic peptides : Design, synthesis, and structural characterization of macrocyclic helical peptides. *J. Org. Chem.* **2001**, 66 (16), 5291–5302.

(30) Pérez de Vega, M. J.; García-Aranda, M. I.; González-Muñiz, R.; A role for ring-closing metathesis in medicinal chemistry : Mimicking secondary architectures in bioactive peptides. *Med. Res. Rev.* **2010**, 31 (5), 677–715.

(31) Brik, A.; Metathesis in Peptides and Peptidomimetics. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350 (11–12), 1661–1675.

(32) Hong, S. H.; Sanders, D. P.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H.; Prevention of undesirable isomerization during olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (49), 17160–17161.

(33) Patgiri, A.; Menzenski, M. Z.; Mahon, A. B.; Arora, P. S.; Solid-phase synthesis of short α -helices stabilized by the hydrogen bond surrogate approach. *Nat. Protoc.* **2010**, 5 (11), 1857–1865.

(34) Granier, C.; van Rietschoten, J.; Kitabgi, P.; Poustis, C.; Freychet, P.; Synthesis and characterization of neurotensin analogues for structure/activity relationship studies. Acetyl-neurotensin-(8–13) is the shortest analogue with full binding and pharmacological activities. *Eur. J. Biochem.* **1982**, 124 (1), 117–124.

(35) Boal, A. K.; Guryanov, I.; Moretto, A.; Crisma, M.; Lanni, E. L.; Toniolo, C.; Grubbs, R. H.; O’Leary, D. J.; Facile and E-selective intramolecular ring-closing metathesis reactions in 310-helical peptides : A 3D structural study. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (22), 6986–6987.

(36) White, J. F.; Noinaj, N.; Shibata, Y.; Love, J.; Kloss, B.; Xu, F.; Gvozdenovic-Jeremic, J.; Shah, P.; Shiloach, J.; Tate, C. G.; Grisshammer, R.; Structure of the agonist-

bound neurotensin receptor. *Nature* **2012**, 490 (7421), 508–513.

(37) Coutant, J.; Curmi, P. a; Toma, F.; Monti, J.-P.; NMR solution structure of neurotensin in membrane-mimetic environments : molecular basis for neurotensin receptor recognition. *Biochemistry* **2007**, 46 (19), 5656–5663.

(38) Bittermann, H.; Einsiedel, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Evaluation of lactam-bridged neurotensin analogues adjusting psi(Pro10) close to the experimentally derived bioactive conformation of NT(8-13). *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (22), 5587–5590.

(39) Härterich, S.; Koschätzky, S.; Einsiedel, J.; Gmeiner, P.; Novel insights into GPCR-peptide interactions : mutations in extracellular loop 1, ligand backbone methylations and molecular modeling of neurotensin receptor 1. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16 (20), 9359–9368.

(40) Einsiedel, J.; Hübner, H.; Hervet, M.; Härterich, S.; Koschätzky, S.; Gmeiner, P.; Peptide backbone modifications on the C-terminal hexapeptide of neurotensin *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (6), 2013–2018.

(41) Molecular Operating Environment (MOE), 2016.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017.

(42) Da Costa, G.; Bondon, A.; Coutant, J.; Curmi, P.; Monti, J.-P.; Intermolecular interactions between the neurotensin and the third extracellular loop of human neurotensin 1 receptor. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, No. November, 37–41.

(43) Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE.; UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* **2004** Oct;25(13) :1605-12

(44) The Claisen Rearrangement : Methods and Applications; Hiersemann, M., Nubbe-meyer, U., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA : Weinheim, Germany, **2007**.

(45) Macrocyclizations undergone without prior acetylation gave significantly lower yields (unpublished results)

3.2 Supplementary information

3.2.1 Additional figures

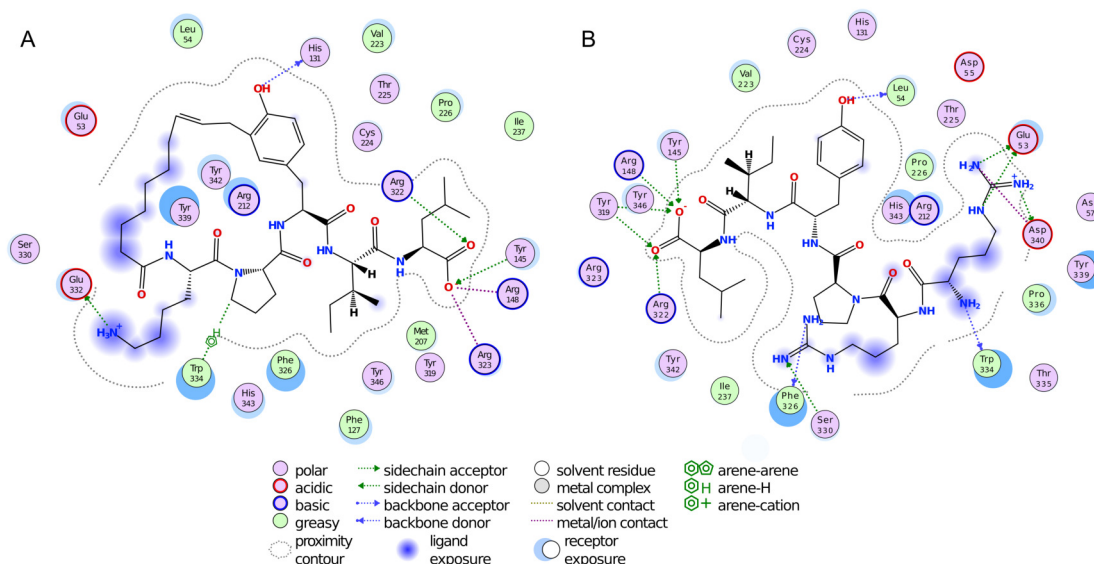


FIGURE 3.7 – Molecular interactions between hNTS1 and ligands. A Compound *10* docked in hNTS1 (homology model based on the rNTS1 crystal 4grv). B NT (8-13) in the same homology model. Interactions between the peptide carboxylate and the four receptor residues are conserved, while the Tyr of **10** is shifted and interacts with His¹³¹ instead of Leu⁵⁴. The number of *N*-terminal interactions between **10** and the receptor is reduced because of the missing polar groups (namely the *N*-terminal α -amine and the lateral chain of Arg⁸).

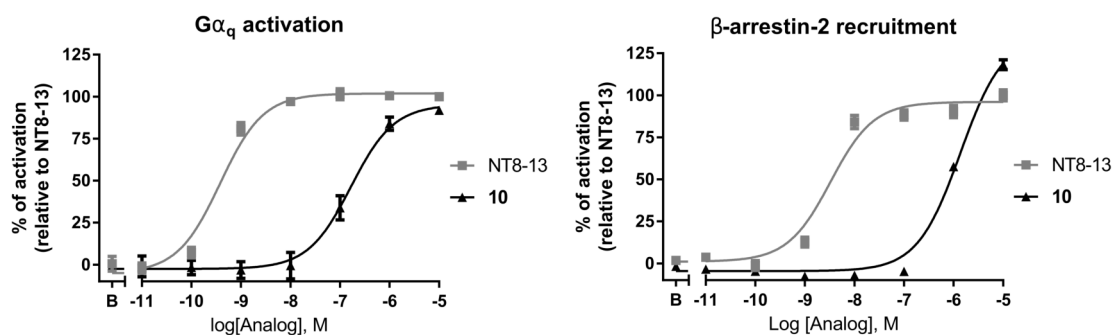


FIGURE 3.8 – Functional activity of **10** compared to NT (8-13). G protein activation and β-arrestin recruitment were assayed using BRET biosensors.

Binding Assay

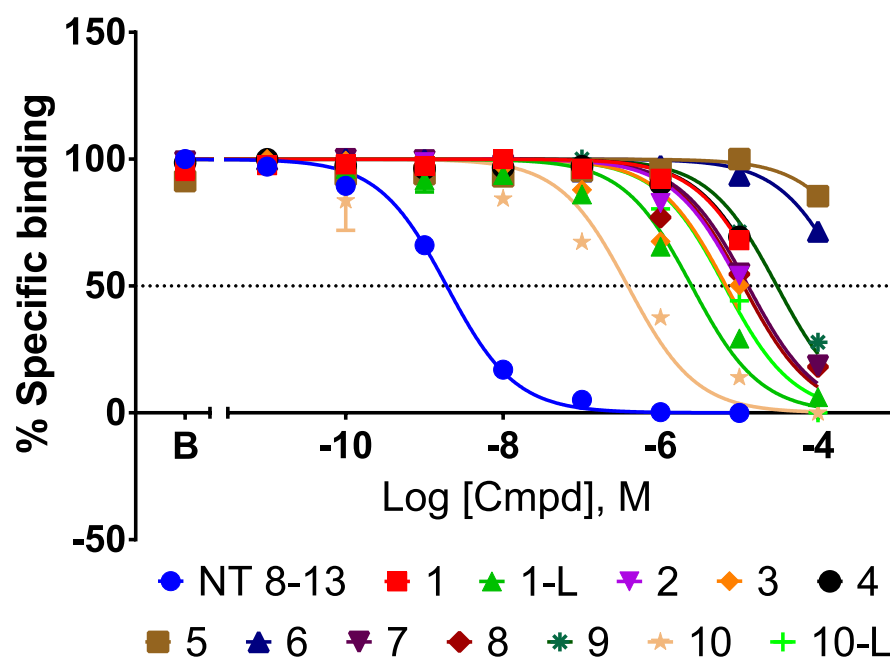


FIGURE 3.9 – Competitive binding curves of compounds **1-10** compared to NT (8-13). Obtained by displacement of [¹²⁵I-Tyr³]NT

3.2.2 Chemistry

NB : in the following, yields are not optimized.

3.2.2.1 Reagents and solvents

Chemical reagents (except for peptide synthesis reagents, see below) were purchased from Sigma-Aldrich at the highest purity available and used with no further purification. Regular solvents came from Fisher Chemicals and anhydrous solvents from EMD Milipore Corporation.

3.2.2.2 Peptide Synthesis

Peptides were synthesized using standard Fmoc chemistry on 2-chlorotrityl resin (loading : 0.75 mmol/g) obtained from Chem Impex or Matrix Innovation. Fmoc-protected amino-acids and coupling reagents were purchased from these manufacturers as well, in the highest purity available and were used as received. Manual peptide synthesis was performed in 12 mL polypropylene cartridges with 20 μ m PE frit from Applied Separations (USA). All quantities given below are for 100 μ mol of peptide (130 mg of resin).

Coupling of the first amino acid to the resin

The resin was swelled in DCM for 15 min, then stirred for 30 min with 1.5 mL of a DCM solution containing 5 eq of the Fmoc-protected amino-acid and DIEA (104 μ L, 6 eq). The resin was washed with DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), and DCM (2 \times 5 mL). Unreacted sites were capped by stirring 30 min with 1.5 mL of a DCM/MeOH/DIEA (7 : 2 : 1) solution and the resin was washed again as described above.

Fmoc deprotection

Fmoc groups were deprotected by treating the resin with a 20% piperidine/DMF solution (2 \times 10 min). The resin was then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL) and DMF (2 \times 5 mL).

Coupling of commercial amino acids

The resin was treated with a solution of Fmoc-amino-acid (0.5 mMol, 5 eq), HATU (95 mg, 5 eq) and DIEA (104 μ L, 6 eq) in DMF (1.5 mL) for 30 min, then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL) and DMF (2 \times 5 mL).

Coupling of non-commercial or costly amino-acids

The resin was treated with a solution of Fmoc-amino acid (0.2 mMol, 2 eq), HATU (38 mg, 2 eq) and DIEA (52 μ L, 3 eq) in DMF (1.5 mL) for 2 h, then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), and DCM (2 \times 5 mL). The procedure was repeated if the resin beads turned blue when submitted to the Kaiser test.¹

Acetylation of (*o*-allyl)Tyrosine

Subsequent to coupling of Fmoc-(*o*-allyl)tyrosine, the resin was stirred for one hour in the presence of acetic anhydride (19 μ L, 2 eq) and DIEA (35 μ L, 2 eq) in DCM (1.5 mL). This step was repeated once or until reaction completion was confirmed by mini-cleavage followed by UPLC-MS analysis. The resin was then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL) and DMF (2 \times 5 mL).

Ring-Closing Metathesis

Dry resin, Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst (12.5 mg, 0.2 eq) and *p*-benzoquinone (11 mg, 1 eq) were placed in a microwave tube which was first purged with anhydrous argon for 10 min. Anhydrous DCE (1.5 mL) was added before submitting the mixture to microwave irradiation (50°C, 60 min) on a Discover SP apparatus from CEM. The resin was then washed with DCM (5 \times 5 mL).

De-acetylation of (*o*-allyl)Tyrosine

The resin was treated with 20% Piperidine/DMF (1.5 mL) for 1h. This step was repeated once or until reaction completion was confirmed by mini-cleavage followed by UPLC-MS analysis. The resin was then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL) and DMF (2 \times 5 mL).

Simultaneous resin cleavage and side-chain deprotections

The resin was transferred to a 20 mL glass vial and stirred for 2 h with 3 mL of a TFA/DCM/TiS (50 :49 :1) solution. The peptide was then precipitated in 20 mL of cold *t*BME, centrifugated (3000 rpm, 15 min, 4°C) and dried in vacuo.

Peptide Purification

The crude product was resuspended in water/acetonitrile (7 :3) and purified on a pre-

¹Kaiser, E. ; Colecott, R.L. ; Bossinger, C.D. and Cook, P.I. *Anal Biochem.* **1970**, 34(2), 595–598.

parative HPLC-MS system from Waters (column XSELECT CSH Prep C18 (19 x 100 mm) packed with 5 μ m particles, UV detector 2998, MS SQ Detector 2, Sample manager 2767 and a binary gradient module) using acetonitrile and water + 0.1 % formic acid as eluents. Isolated fractions were then lyophilized and their purity was assessed using a Waters UPLC H-Class with UV detection PDA equipped with an Acquity UPLC CSH C18 (2.1 x 50 mm) column packed with 1.7 μ m particles with the following gradient : acetonitrile and water with 0.1% TFA (0 \rightarrow 0.2 min : 5% acetonitrile; 0.2 \rightarrow 1.5 min : 5% \rightarrow 95% ; 1.5 \rightarrow 1.8 min : 95% ; 1.8 \rightarrow 2.0 min : 95% \rightarrow 5% ; 2.0 \rightarrow 2.5 min : 5%). MS spectra were recorded on a Waters SQD 2 detector (electrospray) instrument. In general, *E* and *Z* isomers around the unsaturation did not separate. High resolution mass spectra (HRMS) of all analogues were obtained using electrospray infusion ESI-Q-ToF from maXis.

3.2.2.3 Synthesis of amino-acid derivatives

Linker B (Fmoc-Tyr-o-Allyl-OH)² Fmoc-Tyr(Allyl)-OH (5 g, 11.3 mmol) was suspended into 40 mL anhydrous toluene under argon atmosphere at 0°C. Diethylaluminum chloride (12.7 mL of 1.8 mol/L solution in toluene, 2 eq) was added. The reaction was stirred at room temperature for 4 h then quenched at 0°C by addition of 25 mL 6N HCl. The organic phase was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered then evaporated. The product and remaining starting material were purified by flash chromatography. The product was then solubilized in water/acetonitrile 50 :50 and lyophilized, to give 1.5 g of the desired product (30 % yield). ¹H NMR (CDCl₃ /CD₃OD 9 :1, 400 MHz) : 7.7 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.5 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.81 (dd, J = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.92 (m, 1H), 5.0 (dq, J = 1.7, 6.61 Hz, 1H), 4.96 (t, J = 1.4 Hz, 1H), 4.49 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.29 (m, 2H), 4.13 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.47 (br, 4H), 3.28 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.03 (dd, J = 5.3, 14.1 Hz, 1H), δ 2.94 (dd, J = 6.5, 14.1 Hz, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃ /CD₃OD 9 :1, 100 MHz) : δ 173.83, 153.55, 143.80, 141.30, 136.78, 131.23, 128.24, 127.76, 67.07, 127.12, 126.32, 115.36, 115.65, 125.13, 120.0, 54.86, 49.37, 47.16, 37.14, 34.28.

Linker A (Fmoc-Ser(Allyl)-OH)

Boc-Ser(Allyl)-OH : Sodium hydride (4.9 g, 122 mmol, 2.5 eq) was suspended into 20 mL DMF in a dry round-bottom flask under argon atmosphere and placed at 0°C. Boc-Ser-

²The Claisen Rearrangement : *Methods and Applications*; Hiersemann, M., Nubbemeyer, U., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA : Weinheim, Germany, **2007**.

OH (10 g, 48.8 mmol) was dissolved into 80 mL DMF and this solution was added slowly to the flask. After stirring for 30 minutes at 0°C, allyl bromide (5.2 mL, 48.8 mmol, 1 eq) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 4h, then quenched with 500 mL of NH₄Cl saturated aqueous solution. This solution was washed with ethyl acetate (250 mL) then its pH was adjusted to 1-2 by addition of 6N HCl. The product was extracted with 3x300 mL ethyl acetate. The organic phase was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated in vacuo. The product was purified by flash chromatography and obtained as a yellow oil (60 % yield). NMR characterisation concurred with what was previously described.³

Fmoc-Ser(Allyl)-OH : Boc-Ser(Allyl)-OH (650 mg, 2.7 mmol) was dissolved into 10 mL of DCM/TFA (50 :50) and stirred for 2 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude was dissolved into 10 mL of water. The pH of this solution was adjusted to 8-9 by addition of NaHCO₃. Fmoc-Cl (1049 mg, 4.1 mmol, 1.5 eq) was dissolved in THF and this solution was poured over the aqueous solution. The mixture was stirred overnight and THF until completion of the reaction (TLC) was removed by evaporation. The aqueous phase was washed with diethyl ether (5 mL) and its pH adjusted to 2-3 by addition of 1N HCl. The product was extracted with 3x10 mL ethyl acetate. The combined organic phases were washed with brine (10 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated in vacuo. The product was purified by flash chromatography and obtained as a white solid (55 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.59 (dd, J = 7.2, 3.2 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 5.84 (m, 1H), 5.66 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.26 (d, J = 17.0 Hz, 1H), 5.2 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.41 (m, 2H), 4.23 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.02 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 3.94 (dd, J = 9.5, 3.5 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 9.5, 3.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃ 75.4 MHz) : δ 154.90, 136.72, 124.34, 124.21, 121.83, 114.22, 108.27, 107.62, 105.64, 100.52, 98.56, 53.02, 49.92, 47.85, 34.61, 27.65.

3.2.2 Biological methods

Binding Assays

Cell Culture. CHO-K1 cells stably expressing the human NTS1 receptor (hNTS1) (ES-690-C from PerkinElmer, Montréal, QC, Canada) were cultured in Ham's F12 medium at

³As described in Boal, A. K.; Guryanov, I.; Moretto, A.; Crisma, M.; Lanni, E. L.; Toniolo, C.; Grubbs, R. H.; O'Leary, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (22), 6986–6987.

37°C in a humidified chamber at 5% CO₂. Culture media were supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 20 mM HEPES, and 0.4 mg/mL G418.

Competitive Radioligand Binding Assay on hNTS1. Upon reaching 80% confluence, CHO-K1 cells expressing hNTS1 were washed with PBS and frozen at -80°C until use. Cells were scrapped-off the dish with 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5 and centrifuged at 3,000 rpm for 15 min at 4°C. The pellet was then resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH7.5, containing 0.2% BSA (binding buffer). Competitive radioligand binding experiments were performed by incubating 15 µg of freshly prepared cell membranes expressing hNTS1 with 45 pM of ¹²⁵I-[Tyr³]-NT (2200 Ci/mmol) (purchased from PerkinElmer, Billerica, MA) in binding buffer in the presence of increasing concentrations of the analogues ranging from 10⁻¹¹ to 10⁻⁴ M for 60 min at 25°C. After incubation, the binding reaction mixture was transferred into Polyethyleneimine-coated 96-well filter plates (glass fiber filters GF/B, Millipore, Billerica, MA). Reaction was terminated by filtration, and plates were washed three times with 200 µL of ice-cold binding buffer. Glass filters were then counted in a γ-counter (2470 Wizard2, PerkinElmer, Mississauga, ON, Canada). Non-specific binding was measured in the presence of 10⁻⁵ M unlabeled NT (8-13) and represented less than 5% of total binding. IC₅₀ values were determined from the competition curves as the unlabeled ligand concentration inhibiting half of the ¹²⁵I-[Tyr³]-NT-specific binding.

Data Analysis. Competitive radioligand binding data were plotted using Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA) using the One-site-Fit Log(IC₅₀) and represented the mean ± SEM of at least three separate experiments each done in triplicate.

BRET Assays⁴ CHO-K1 cells (ATCC, CCL-61) were cultured in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 20 mM HEPES at 37°C in a humidified chamber at 5% CO₂. Cells were seeded into 10-cm petri dishes at a density of 1.5 × 10⁶ cells; 24 h after seeding, cells were transfected with plasmids coding for hNTS1-GFP10/RlucII-β-arrestin2, or with hNTS1/G_{αq}-RlucII/G_{β1}/GFP10-G_{gamma1} using PEI. Cells were transferred into 96-well plates at a concentration of 50 000 cells/well 24 h after transfection and incubated at 37°C overnight. Then, cells were washed with PBS and 90 µL of HBSS was added in each well; cells were then stimulated with increasing concen-

⁴Galés, C.; Rebois, R. V.; Hogue, M.; Trieu, P.; Breit, A.; Hébert, T. E.; Bouvier, M. *Nature Methods* **2005**, 2(3), 177–144

trations of each analog ranging from 10^{-11} to 10^{-5} M for 20 min (β -arrestin2 recruitment) or 5 min ($G_{\alpha q}$ activation) at 37°C. After stimulation, coelenterazine 400A was added in each well to a final concentration of 5 μ M and the plate was read using filter selected for BRET2 measurement on a Mithras 2 plate reader (Berthold Technologies, Tennessee, USA). BRET2 ratio was determined as GFP10em /RlucIIem. Data were analyzed using GraphPad Prism 7, normalization was done by using the BRET2 ratio of nonstimulated cells as 0% and the ratio of cells stimulated with 10^{-6} M NT (8-13) as 100% of activation. EC₅₀ values were determined using the dose response-stimulation log(agonist) vs response (three parameters) and represent the mean \pm SEM of at least three separate experiments, each performed in triplicate.

Plasma Stability Assay

Rat plasma was obtained by centrifugation of rat blood (13000 rpm, 5 min, 4°C). 6 μ L of a 1 mM aqueous solution (10% DMSO) of peptide were incubated with 27 μ L of rat plasma at 37°C for 1, 2, 4 and 8 hours (1, 3 and 5 min for NT (8-13)). At these times, proteolytic degradation was halted by adding 70 μ L acetonitrile/ethanol (1 :1), 0.5 μ M nicotinamide solution and vortexing. Samples were kept on ice until centrifugated (13000 rpm, 5 min, 4°C) and the supernatant was filtered on a 4 mm nylon 0.2 μ m syringe filter and analyzed by UPLC-MS. Each experiment was repeated three times. Data were analyzed using GraphPad Prism 7's one phase decay equation.

3.2.2 Modelling procedures

All modelling was done using MOE.⁵

Superimposition to NT (8-13) : Macrocycles (**1**, **2** and **6**) were built using MOE's builder then minimized on all atom using Amber 10 : EHT forcefield and 0.1 kcal/mol/Å² RMS as a gradient. The X-ray structure of rNTS1-bound NT 8-13 (pdb ID 4grv)⁶ was loaded and both structures were protonated and their partial charges were calculated. NT 8-13 was set as "fixed" and the structures were superimposed using the Flexible Alignment module. The iteration limit was fixed to 200, the failure limit to 20 and the energy cutoff to 15 Kcal/mol.

⁵Molecular Operating Environment (MOE), 2016.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2017**

⁶ White, J. F.; Noinaj, N.; Shibata, Y.; Love, J.; Kloss, B.; Xu, F.; Gvozdenovic-Jeremic, J.; Shah, P.; Shiloach, J.; Tate, C. G.; Grishammer, R. *Nature* **2012**, 490 (7421), 508–513.

Docking : Macrocycles **7-10** were built using MOE's buider, minimized, protonated and partial charges were calculated. Conformational search with the "Conformatial Search" module were carried out on the *Z* and *E* isomers independently using Amber10 :EHT as forcefield and the LowModeMD as a method, performing molecular dynamics perturbations along low frequency vibrational mode. Rejection limit was fixed to 100, iteration limit to 10 000, RMS gradient to 0.005 and MM iteration limit to 500. Two conformations were judged equal if the optimal heavy atom RMS superposition distance was less than 0.25Å. The conformations obtained were then docked into a hNTS1 homology model (built from rNTS1 X-ray structure 4grv using MOE's tools).

4 DEUXIÈME ARTICLE

Structural Optimization and Characterization of New Analgesia-Inducing Macrocyclic Neurotensin 8-13 Analogs.

Auteurs de l'article: Marc Sousbie, Mélanie Vivancos, Élie Besserer-Offroy, Rebecca L. Brouillette, Jean-Michel Longpré, Richard Leduc, Philippe Sarret, and Éric Marsault

Statut de l'article: Accepté dans Journal of Medicinal Chemistry, en révision

Avant-propos: Mes contributions a cet article ont consisté en premier lieu à concevoir et modéliser tous les macrocycles présentés ici. J'ai également été responsable de la synthèse des chaînons de macrocyclisation et des macrocycles. Concernant la caractérisation, j'ai effectué les essais de stabilité *in vitro* et les essais d'affinité sur NTS1. Les résultats étant positifs, la progression du projet a nécessité l'agrandissement de l'équipe afin d'avoir un plus grand panel d'essais que je ne pouvais pas mener moi-même tels que les tests fonctionnels et *in vivo*. J'ai aussi rédigé la majeure partie de l'article.

Résumé: Cet article reprend le développement d'analogues macrocycliques de la NT (8-13) là où le précédent article s'est arrêté. À partir du prototype de macrocycle déjà existant, une série de nouveaux macrocycles a été conçue et produite afin de construire une relation structure-activité. C'est en particulier la structure du résidu *N*-terminal, qui est l'un des deux chaînons impliqués dans la macrocyclisation, qui a été explorée. Une dizaine de macrocycles a donc été produite et caractérisée (l'affinité pour NTS1, la capacité à activer le récepteur et la stabilité plasmatique ont été déterminées). Sur la base de ces informations, deux macrocycles prometteurs ont été sélectionnés pour être caractérisés plus avant en essais *in vivo*.

Nous avons ainsi démontré que ces deux macrocycles provoquaient un fort effet analgésique dans deux modèles de douleur (aigüe et inflammatoire). Cet effet est comparable à celui obtenu avec un analogue linéaire de la NT (8-13) connu de la littérature. Nos composés induisent aussi les effets physiologiques indésirables de la NT, c'est-à-dire l'hypothermie et l'hypotension, quoique la tension semble revenir à la normale plus rapidement pour nos composés que pour le peptide linéaire choisi comme référence.

Ces composés ont fait l'objet d'une demande de brevet provisoire.

Abstract : The neurotensin receptors are attractive targets for the development of new analgesic compounds, as potential alternatives or adjuvants to opioids. Herein, we report the structural optimization of our recently reported macrocyclic peptide analogues of NT (8-13). The macrocycle was formed via ring-closing metathesis (RCM) between the ortho allylated tyrosine residue in position 11 and the side chain of alkene-functionalized amino acid in position 8. Minute modifications led to significant binding affinity improvement (K_i went from 5600 nM to 15 nM) with greatly improved plasma stability, as well as identification of structural features influencing these parameters. The signaling profiles of these new macrocycles were determined on the NTS1 receptor and the two most potent and stable analogs were then assessed for their physiological effects in in vivo rodent models. Both compounds displayed strong analgesic effects.

4.1 Introduction

Opioids, despite their important adverse effects (e.g. tolerance, dependence, constipation, respiratory depression)¹ and relative pain control efficacy in some cases,² are still the treatment of choice for different types of acute and chronic pain conditions.³ Their effects are mediated by G protein-coupled receptors (GPCRs) identified as μ , δ and κ -opioid receptors. Neurotensin (NT) is a tridecapeptide of sequence pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu which was first isolated from bovine hypothalamus extract.⁴ NT is the endogenous ligand of two GPCRs, NTS1 and NTS2, as well as the single transmembrane domain intracellular sorting protein NTS3/sortilin.⁵ In the gut, NT acts as a hormone via NTS1 while it behaves as a neuromodulator in the central nervous system via both NTS1 and NTS2 activation.⁶ Of particular importance, NT induces a strong analgesic action when administered centrally to rodents,⁷ being more potent than morphine at equimolar doses.⁸ This potent analgesic effect has been attributed to the activation of both receptor subtypes, together and independently from each other.^{9,10} Most importantly, NT-induced analgesia is independent from opioid receptors¹¹ and does not cause addiction,^{12,13} which makes NT receptors attractive therapeutic targets for the management of chronic pain. Accordingly, much effort has been undertaken in order to improve the understanding of the neurotensinergic system, with the aim of providing a much-needed alternative to opioids. From a pharmacophoric standpoint, the last six residues of NT are sufficient to retain full biological activity of the endogenous peptide.¹⁴ As a result, most subsequent analogues have been based on the shorter NT (8-13) sequence. As a peptide, NT (8-13) is not orally bioavailable and its short in vivo half-life (below 5 min) is not compatible with use as an analgesic drug. Structural modifications have allowed to improve upon these properties, namely replacement of natural amino acids with their D-isomers,¹⁵ protection of peptidic bonds by reduced amide bonds¹⁶ or *N*-methylation,^{17,18} to name a few. The use of unnatural amino acids even led to analogues showing effective analgesia when injected intravenously, suggesting some level of central bioavailability.^{19,20}

Structural studies. Since the discovery of NT, a tremendous amount of work has been produced to elucidate the structural determinants of the ligand-binding pocket of NTS1. Using NMR,^{21–23} mutagenesis^{14,24} or constrained analogues,^{25,26} several groups predicted the linear (“ β -strand”) shape of the receptor-bound NT (8-13) before its recent confirmation by X-ray crystallography.^{27–30} The crystal structures indeed revealed that the C-terminal carboxylic acid of NT (8-13) docks into the bottom of the NTS1 binding pocket while the *N*-terminal arginines remain at the interface between the receptor and the ex-

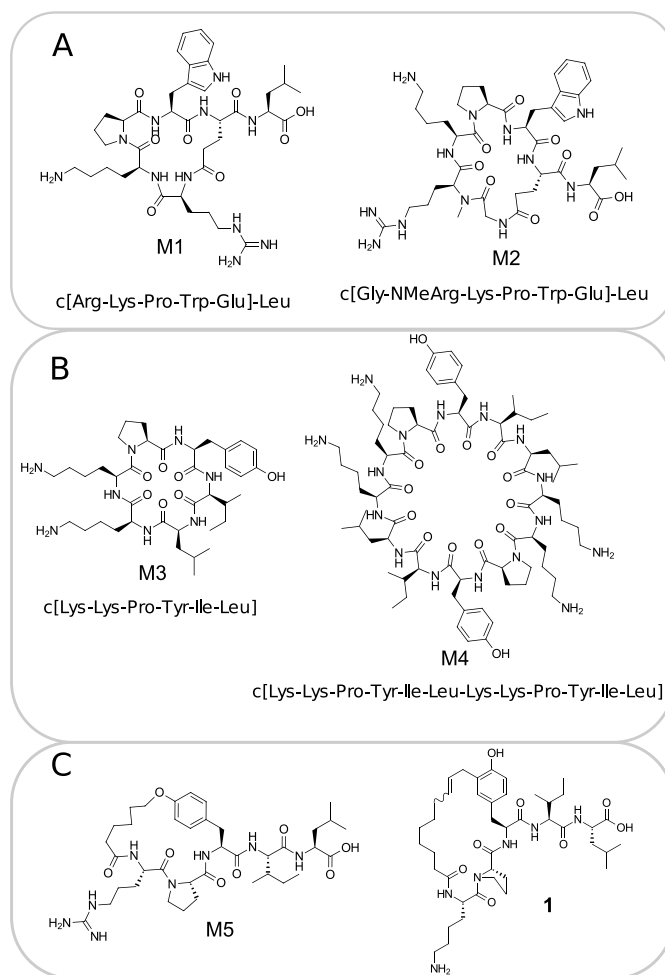


FIGURE 4.1 – Previously published macrocyclic analogues of NT (8-13). K_i for NTS1 are values reported in the original articles : M1, 190 nM; M2, 3.5 μ M;³¹ M3, 300 nM;³² M4, 150 nM;³³ M5, 450 nM;³⁴ 1, 394 nM.

tracellular medium.

Macrocycles. The relatively linear shape of the NT peptide when bound to NTS1 may account for the low number of attempts at macrocyclization. To date, only few neurotensinergic macrocycles have reached relatively high affinity for NTS1. Successful attempts include tail-to-side-chain macrocyclic analogues of NT (8-13) **M1** (cyclo[Arg-Lys-Pro-Trp-Glu]-Leu) and **M2** (cyclo[Gly-NMeArg-Lys-Pro-Trp-Glu]-Leu) (Figure 4.1A), with affinities of 190 nM and 3.5 μ M for NTS1, respectively.³¹

Rather counter-intuitively with respect to published Structure-Activity Relationship (SAR), head-to-tail macrocyclic analogues of NT (8-13) have shown interesting properties in vivo : Monomer **M3** (cyclo[Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu]) and dimer **M4** (cyclo[Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu]) possess binding affinities around 300 nM and 150 nM, respectively (Figure 4.1B). Of particular note, both displayed central analgesic effect when injected intravenously at doses of 5 mg/kg and 0.3 mg/kg, respectively, suggesting some level of central penetration.^{32,33}

Design based on the available structural information at the time led to the creation of macrocycle **M5** (Figure 4.1C) where the hydroxyl group of the central tyrosine is linked to an aliphatic chain which replaces the *N*-terminal arginine of NT (8-13). This **M5** compound has an affinity for NTS1 of 450 nM, despite the absence of an arginine residue at the *N*-terminal position.³⁴ Notwithstanding the limited development of macrocyclic analogues of NT (8-13), macrocyclization has repeatedly been used as a robust way to improve peptide properties for therapeutic use, as it is known to ameliorate some of the limitations of peptides. It is indeed used to protect peptides against proteolytic degradation,^{35–38} to provide control over conformation,³⁹ and more broadly to improve their pharmacological properties.⁴⁰ In recent works, we searched for favourable macrocyclization sites on NT (8-13). Using Ring-Closing Metathesis (RCM) for its versatility⁴¹ and compatibility with peptides,^{42,43} we have shown with macrocycle **1** (Figure 4.1C) that macrocyclization between residues in position 8 and 11 of NT (8-13) is tolerated, yielding an analogue with a binding affinity of 394 nM (compared to its linear counterpart **1-L** with IC₅₀ 1390 nM). Macrocycle **1** behaves as an agonist of NTS1 with much longer plasma stability than NT (8-13) (12h vs 3 min, Table 2).⁴⁴ Here, we describe the optimization of this new template to determine its SAR, improve binding affinity, and the broader in vitro and in vivo characterization of the resulting promising compounds.

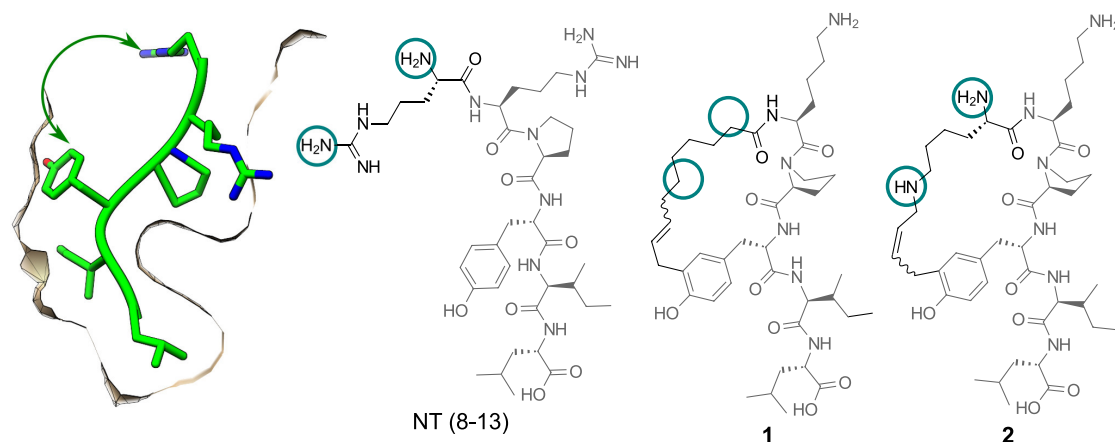


FIGURE 4.2 – Design of macrocycles **1** and **2**. Left : The conformation of neurotensin 8-13 as found in its crystallized complex with NTS1.

4.2 Results and discussion

Design and Synthesis. As shown in Figure 4.2, **1** retains all the residues of NT (8-13) except Arg⁸ (Arg⁹ was replaced with Lys, which has little impact on binding affinity¹¹), however macrocyclization has a favorable effect on its binding to NTS1 compared to its linear analogue **1-L**.⁴⁴ We therefore hypothesized that re-introducing the *N*-terminal α amino group of NT (8-13) as well as a charged group to mimic the guanidine function would positively contribute to lower the IC₅₀ of **1** toward that of NT (8-13) (394 nM and 0.8 nM, respectively). Accordingly, macrocycle **2** was designed (Figure 4.2 and Scheme 4.3). Its linear precursor **2a** was produced using Fmoc solid-phase peptide synthesis (SPPS). The first allyl group necessary for the RCM reaction was introduced with the previously described Fmoc-Tyr-*o*-Allyl-OH.⁴⁴ *N* ^{α} -Boc,*N* ^{ϵ} -Fmoc-Lys was used as the *N*-terminal residue. After deprotection of the Fmoc on the lateral chain of Lys, a Nosyl group was introduced on resin, followed by acetylation of the tyrosine phenol to reduce interference during RCM. The activated amine was then readily allylated using Fukuyama-Mitsunobu conditions optimized for SPPS to give intermediate **2b**.⁴⁵ Macrocyclization was subsequently performed using Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst and *p*-benzoquinone⁴⁶ under microwave irradiation.⁴⁷ RCM was followed by simultaneous deprotection of the Nosyl and acetyl groups via treatment with 2-mercaptoethanol and DBU. Analogues **3-6**, synthesized using the same strategy, all possess a 23-membered ring with variations on the functional groups on the linker, while analogues **7-10** keep the same moieties but vary in ring size, as summarized in Table 4.1 (individual structures are displayed in Supplementary Information). The *N*-terminal lysine was replaced

with commercially available Fmoc-(S)-Octenylalanine, which possesses the same length as allylated lysine, as a precursor to macrocycle **3**. This did not require the Fukuyama-Mitsunobu-related steps but the tyrosine was still acetylated prior to cyclization because it delivered higher yields (unpublished results). The synthetic process toward **4** was identical to **2**, except that D-lysine was used at the *N*-terminus. To obtain Nosyl-functionalized macrocycle **5**, the post-Fukuyama-Mitsunobu deprotection (Scheme 4.3, step e) was replaced by treatment with 20% piperidine in DMF to selectively remove the acetyl on tyrosine. To generate macrocycle **6**, Fmoc-6-aminohexanoic acid was obtained from commercial unprotected aminohexanoic acid and used in lieu of the terminal lysine.

Macrocycles bearing diverse sizes were produced using exactly the same methods as for the synthesis of **2** except that Lys was replaced by ornithine (Orn) or diaminobutyric acid (Dab) for shorter analogues **7** and **8**, respectively, and butenyl and pentenyl alcohol were used instead of allyl alcohol for longer analogues **9** and **10**, respectively. After synthesis, macrocycles were purified using preparative HPLC to >95% purity prior to testing.

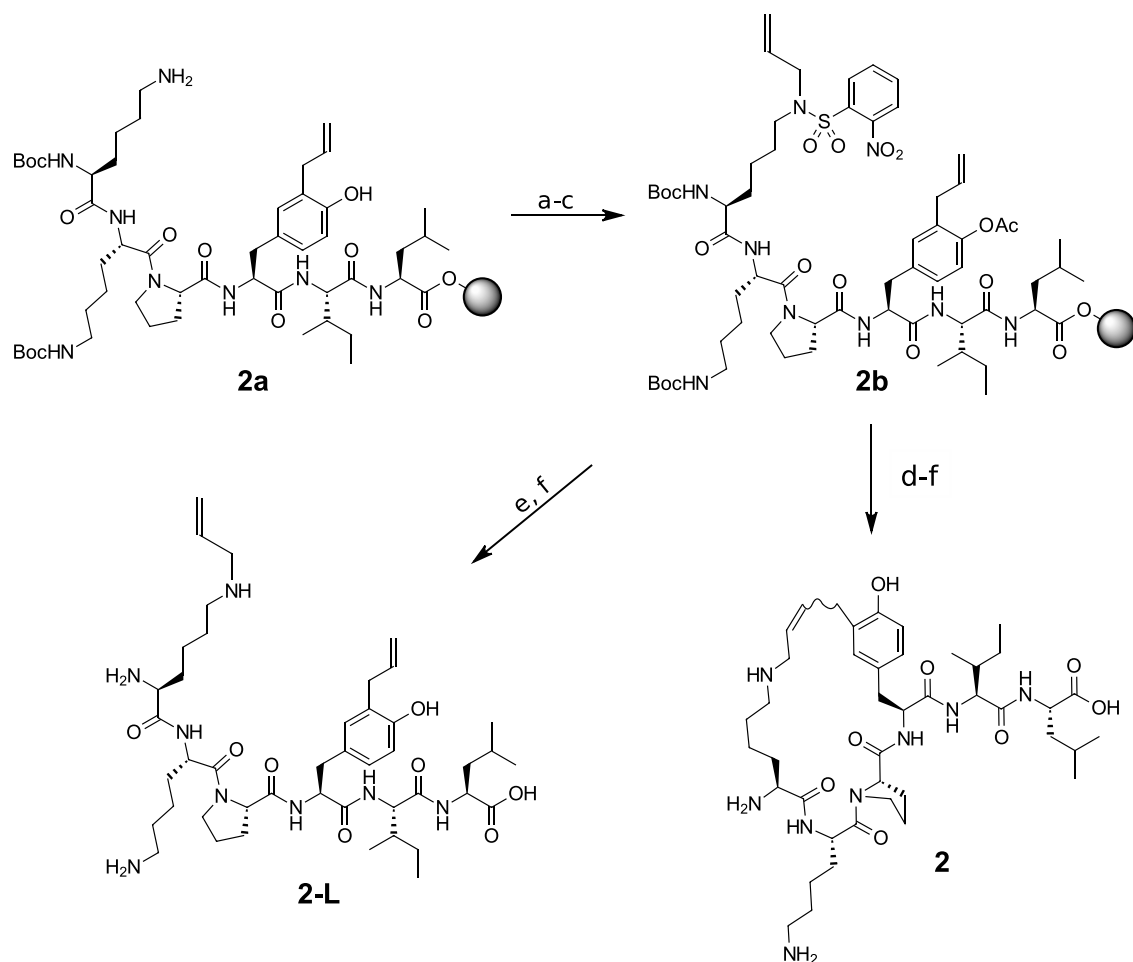
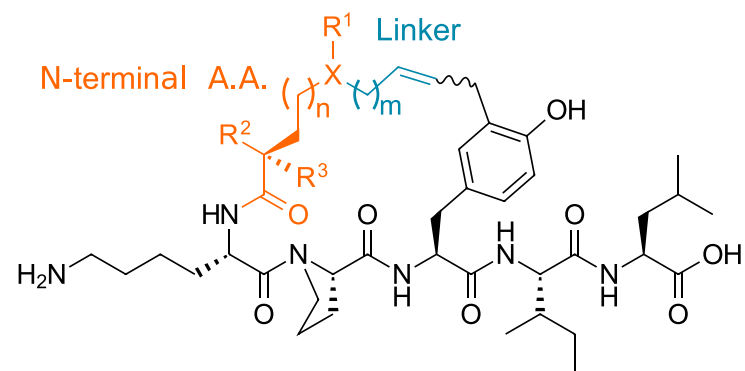


FIGURE 4.3 – Synthesis of macrocycle **2** and its linear counterpart **2-L**. (a) Nosyl-Cl (4eq), Collidine (10eq), NMP, rt, 2x30min; (b) Ac₂O (2eq), DIEA(2eq), DCM, rt, 2x1h; (c) Allyl-OH (10eq), PPh₃ (5eq), DIAD (5eq), THF, rt, 2x30min; (d) Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst (0.2eq), *p*-benzoquinone (1eq), DCE, 50°C, 1h; (e) 2-mercaptoethanol (10eq), DBU (5eq), NMP, rt, 2x30min; (f) TFA/DCM/TiS, rt, 1h.



Compound	N-terminal A.A.	Linker	R1	R2	R3	X	n	m	Ring size
1	Nonenoic acid	-	H	H	H	CH	2	1	22
2	L-Lys	Allyl	H	NH ₂	H	N	3	1	23
3	(S)-Octenylala	-	H	NH ₂	CH ³	CH	2	2	23
4	D-Lys	Allyl	H	H	NH ₂	N	3	1	23
5	L-Lys	Allyl	Nosyl	NH ²	H	N	3	1	23
6	Aminohexanoic acid	Allyl	H	H	H	N	3	1	23
7	L-Orn	Allyl	H	NH ₂	H	N	2	1	22
8	L-Dab	Allyl	H	NH ₂	H	N	1	1	21
9	L-Lys	Butenyl	H	NH ₂	H	N	2	2	24
10	L-Lys	Pentenyl	H	NH ₂	H	N	3	3	25
11	H-Lys-[ΨCH ₂ NH]-Lys-Pro-Trp- <i>tert</i> Leu-Leu-OEt (PD149163) ¹⁶								

Tableau 4.1 – Summary of compounds in this study.

Binding affinity (Table 4.2 and Figure S1). As hypothesized, the introduction of amines on the *N*-terminal linker greatly improved binding affinity. Indeed, **2** displayed a 130-fold increased affinity compared to **1** (43 vs 5600 nM).

D-Lys analogue **4**, however, possessed a much lower affinity (K_i 772 nM). This can tentatively be attributed to the orientation of the α -amino group, which may be involved in less favourable interactions with the receptor, and/or to a broader change in macrocycle conformation.

By comparison, keeping the conformation of **2** and adding a bulky Nosyl group on the interface between the receptor and the extracellular medium (macrocycle **5**) was detrimental for affinity, with nearly 8-fold increase in the K_i value.

Since **2** bears two extra amino groups compared to **1**, the relative impact of both amines was investigated by comparison with **3**, which only carries the α -amine, and **6**, which only bears the endocyclic amine. Macrocycles **3** and **6** possessed K_i of 156 and 656 nM, respectively. Thus, the endocyclic amine appears less important than the α -amine, which is noteworthy because it suggests that the endocyclic amine in macrocycles is not as important as the lateral chain of Arg in NT (8-13) and is not necessarily involved in the same ligand-receptor interaction (cf. “Modelling” section).

Compounds **7-10** summarize the influence of ring size on binding affinity. **7**, with its ornithine at the linker position forming a 22-membered ring, possessed the best binding affinity (15 nM) in this series. Affinity decreased for 21-membered ring **8** (one carbon shorter on the *N*-terminal side) as well as **9** (one carbon longer on the *N*-terminal side) and **10** (two carbons longer on the *N*-terminal side).

As noted in Table 4.2 legend, the slopes of the concentration-displacement binding curves ranged from 0.29 to 0.81. This parameter, when different from unity, reflects the multiples equilibria occurring during a competitive binding experiment. Here, we might explain the shallow steepness of the binding curves by negative cooperativity. Another explanation could be the binding difference between Z and E isomers (for which docking results were marginally different, as shown in figure S2), however this latter being less probable considering that non-macrocyclic analogs (optically pure) also possessed a pseudo-Hill Slope of less than one.

In conclusion, the ideal features for this macrocyclic template to achieve optimal affinity would be to have both the endocyclic and α -amine, with a ring size of 22, which corresponds to compound **7**.

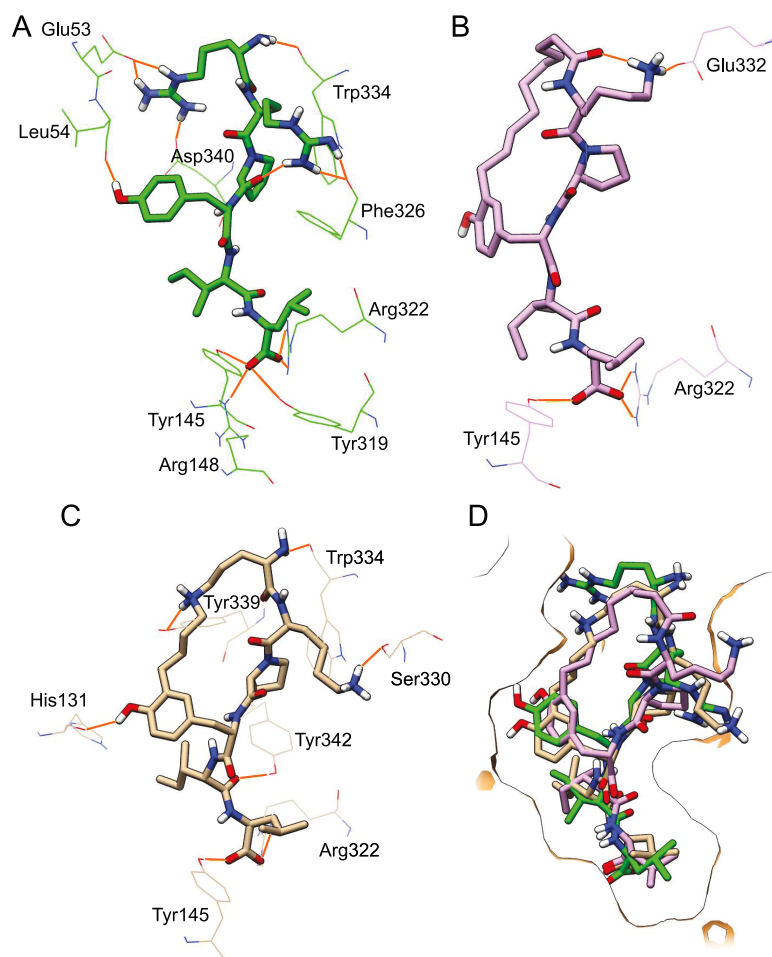


FIGURE 4.4 – Molecular Modelling of prototype macrocycles **1** and **7**. Ligands are represented as sticks and receptor residues involved in hydrogen bonds are represented as wireframe. (A) Green : NT (8-13); (B) Magenta : **1**; (C) Tan : **7**. (D) Superimposition of all three compounds. Graphics made using UCSF Chimera package.⁴⁹ (NB : numbering based on the human NTS1)

Molecular modelling. To get better insight into the interactions between the above macrocycles and NTS1, a homology model of the human NTS1 was built based on the available rat NTS1 crystal structure (PDB id 4grv)²⁷ using the Molecular Operating Environment (MOE) package,⁴⁸ and macrocycles **1** and **7** were docked (Figure 4.4). The reference compound **1** (Figure 4.4B, magenta) seems to be involved in fewer hydrogen bonds with the NTS1 receptor than NT (8-13) (Figure 4.4A, green), which could account for its lower affinity. The lack of polar groups at the *N*-terminal position is mostly responsible for this but the tyrosine also appears to lose its interaction with the Leu⁵⁴ carbonyl group, which could be due to the linker pushing Tyr away from this residue.

Compound **7**, on the other hand, can potentially establish more hydrogen bonds with NTS1

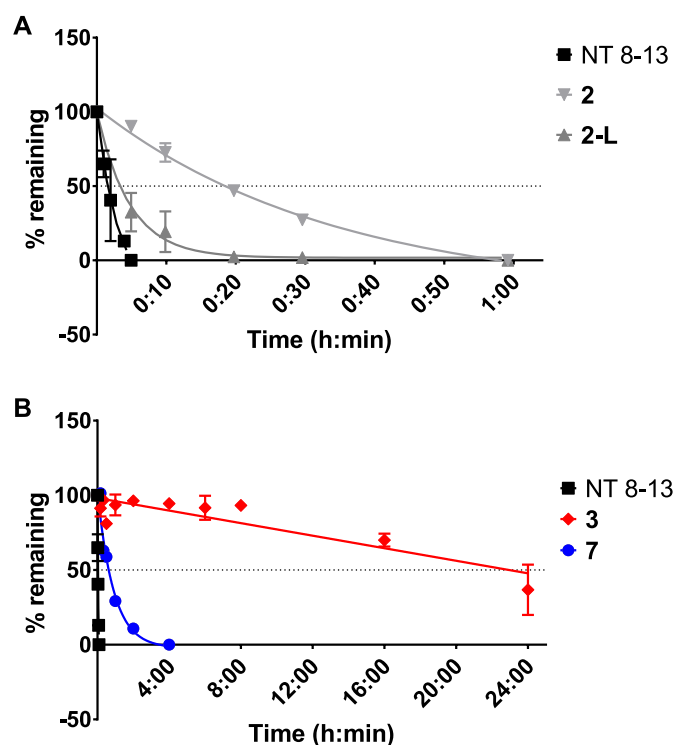


FIGURE 4.5 – (A) Comparison of **2** and **2-L**. (B) Comparison of the compound with the highest affinity **7** and the compound with the best ratio affinity/stability **3**.

(Figure 4.4C, Tan). The *N*-terminal amines of **7** and NT (8-13) are paired with similar receptor residues while the tyrosine of **7** also seems deeper in the binding pocket although it forms an interaction with the His¹³¹ imidazole ring instead of the Leu⁵⁴ carbonyl.

Stability. The ability of compounds to resist proteolytic degradation was estimated by incubation in rat plasma (Table 4.2). As emphasized in Figure 4.5A, **2** not only possessed a greater resistance to protein degradation than NT (8-13) ($t_{1/2}$ 19 min and 3 min, respectively), it was also more resistant than its linear counterpart **2-L** ($t_{1/2}$ = 5 min).

Yet, macrocyclization is not the only factor to influence stability. **3**, **4** and **6** all exhibited half-lives around 24 h (Table 4.2), which is far greater than the other macrocycles (except for **1**, they are all completely degraded after a couple of hours). The *N*-terminal residue on all the short-lived macrocycles possesses an L-amino acid with both the endocyclic and α -amines, whereas the three long-lived macrocycles either possess a D-lysine in position 8, or one of the amines is missing. Unfortunately, these features are not in line with what is required for optimal binding affinity. Nevertheless, **3** (IC₅₀ 132 nM, $t_{1/2}$ 24h) offers a good compromise.

Functional assays. The ability of all the macrocycles to activate NTS1 was assessed using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-based biosensors reporting the dissociation of G proteins or the recruitment of β -arrestins to the receptor. NTS1 is capable of activating several signaling pathways,⁵⁰ thus the activation of $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 13}$, β -arrestin 1 and β -arrestin 2 pathways was monitored. Results are presented as EC_{50} in Table 4.2 for all compounds and as full curves in Figure 4.6 for selected compounds (full curves of all compounds are available as Supplementary Information).¹

Compound **7**, which displays the highest affinity for NTS1, possessed EC_{50} of 3 nM on both the $G_{\alpha q}$ and β -arrestin 2 pathways, which is close to the values obtained for NT (8-13) (0.6 nM on both pathways). Furthermore, analogues **2** and **3** exhibited very similar EC_{50} values on all pathways (respectively 29 and 27 nM on the $G_{\alpha q}$ pathway, for instance), minimizing the importance of the endocyclic amine. The macrocycle ring size does not seem to influence the functional activity. Indeed, macrocyclic analogues **3**, **7**, **8**, **9** and **10** showing ring size ranging from 22 to 25 exhibited similar ability to modulate G-protein activation and β -arrestin recruitment.

Finally, **1** is the only macrocycle more prone to activate G proteins (EC_{50} $G_{\alpha q}$ 166 nM) than β -arrestins (EC_{50} β -arrestin 1 1533 nM). All the others possessed similar EC_{50} values for the tested pathways and no signaling bias has emerged from these results.

¹Voir annexe B.

Compounds	Binding affinity K_i NTS1 (nM) ^a	$G_{\alpha q}$ activation EC_{50} (nM) ^b	$G_{\alpha 13}$ activation EC_{50} (nM) ^b	β_{arr1} recruitment EC_{50} (nM) ^b	β_{arr2} recruitment EC_{50} (nM) ^b	Plasma half-life ^c
NT (8-13)	1.29 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.04	0.6 ± 0.07	0.6 ± 0.06	3 min
1	5600 ± 41	166.2 ± 13	433 ± 32	1500 ± 159	1370 ± 126	12 h
1-L	> 10000	ND	ND	ND	ND	ND
2	43 ± 8	29 ± 4	66 ± 7	52 ± 8	21 ± 2	19 min
2-L	191 ± 98	7 ± 0.7	26 ± 4	15 ± 3	9 ± 1	5 min
3	156 ± 43	27 ± 3	54 ± 9	37 ± 8	28 ± 7	≈ 24 h ^d
4	772 ± 200	182 ± 24	287 ± 42	310 ± 61	201 ± 24	≈ 24 h ^d
5	328 ± 142	74 ± 10	119 ± 22	63 ± 12	92 ± 13	1.4 h
6	656 ± 100	57 ± 7	239 ± 48	96 ± 16	96 ± 11	≈ 24 h ^d
7	15 ± 2	3 ± 0.3	11 ± 0.7	4 ± 0.4	3 ± 0.3	30 min
8	155 ± 28	18 ± 1	55 ± 5	35 ± 3	19 ± 2	2.5 h
9	305 ± 46	15 ± 0.9	52 ± 4	24 ± 3	15 ± 1	15 min
10	903 ± 135	39 ± 3	138 ± 14	50 ± 4	24 ± 3	18 min
11	159 ⁵¹	-	-	-	-	-

Tableau 4.2 – Affinity, potency and stability of the macrocycles. Results are presented as the mean of 3 or more experiments ± SEM. (a) Affinity (K_i Values) determined by competitive receptor radioligand binding assay with ¹²⁵I-[Tyr³]NT using CHO-K1 cell membranes stably expressing hNTS1. Pseudo-Hill Slope of concentration-displacement curves range from 0.29 to 0.81. (b) Potency values obtained in BRET-based experiments conducted in CHO-K1 cells transiently transfected with hNTS1 and BRET biosensors. (c) Plasma stability as determined by incubation in rat plasma at 37°C. (d) 24 h is the longest time tested. For these compounds, about 50% starting materials remained at that time.

Analgesic properties. Macrocycles **7**, with the highest affinity and potency in functional assays and **3**, with the highest stability, were selected for further testing in vivo. NT is known for its potent analgesic effects, which has been demonstrated in numerous animal pain models.⁵² The analgesic actions of **3** and **7** were then compared to those of reference compound **11** (PD149163), a linear analogue of NT (8-13), previously shown to exert a potent analgesic effect via NTS1.^{9,16,53}

First, the antinociceptive effects of **3**, **7** and **11** were tested in an acute nociception assay measuring their ability to extend the response latency to thermal noxious stimuli in Sprague-Dawley rats. Upon intrathecal (i.t.) injection, **7** dose-dependently increased the latency of the tail flick response (Figures 4.7A and 4.7B), with ED₅₀ 4.63 µg/kg. There was no apparent increase in latency for doses inferior to 1 µg/kg and the analgesic effect reached a plateau around 10 µg/kg.

Comparison of the analgesic efficacy of compounds **3**, **7** and **11** at 30 µg/kg (considered equivalent doses given the minor molecular weight differences between the compounds) is shown in Figure 4.7C. Both **3** and **7** sustainably increased the latency of the tail-flick reflex compared to baseline after i.t. injection. The fact that the major difference in stability between the two compounds is not reflected here can tentatively be attributed to the central injection used for this assay, which bypasses the encounter with plasma proteases. Maximal possible effects (MPE, Figure 4.7D) of **3** and **7** were 70% and 50%, respectively, which is comparable to the analgesic action of the previously reported compound **11** (MPE 75%).

The macrocyclic compounds were also tested in the formalin tonic pain model. In this test, formalin was injected into the rat right hind paw. When treated i.t. with saline, the formalin typically produces a biphasic nociceptive behavioral response characterized by an acute phase (0-9 min), followed by a more prolonged inflammatory phase (21-60 min) (Figure 4.7E). As demonstrated by calculating the area under curve (AUC), both **3** and **7** significantly reduced the pain score during the inflammatory phase, exhibiting equivalent potency as the reference analogue **11**, (Figure 4.7F). Again, the lack of difference in the duration of effect of these two compounds may be explained by the mode of administration.

Other physiological effects. Aside from analgesic effects, NT also causes hypotension in an NTS1-dependent manner when administered i.v. and causes hypothermia when administered either i.t. or i.v.^{54,55} The ability of compounds to induce hypothermia after i.v. injection confirmed the dose-dependent effect of **7** (Figures 4.8A and 4.8B), with an ED₅₀

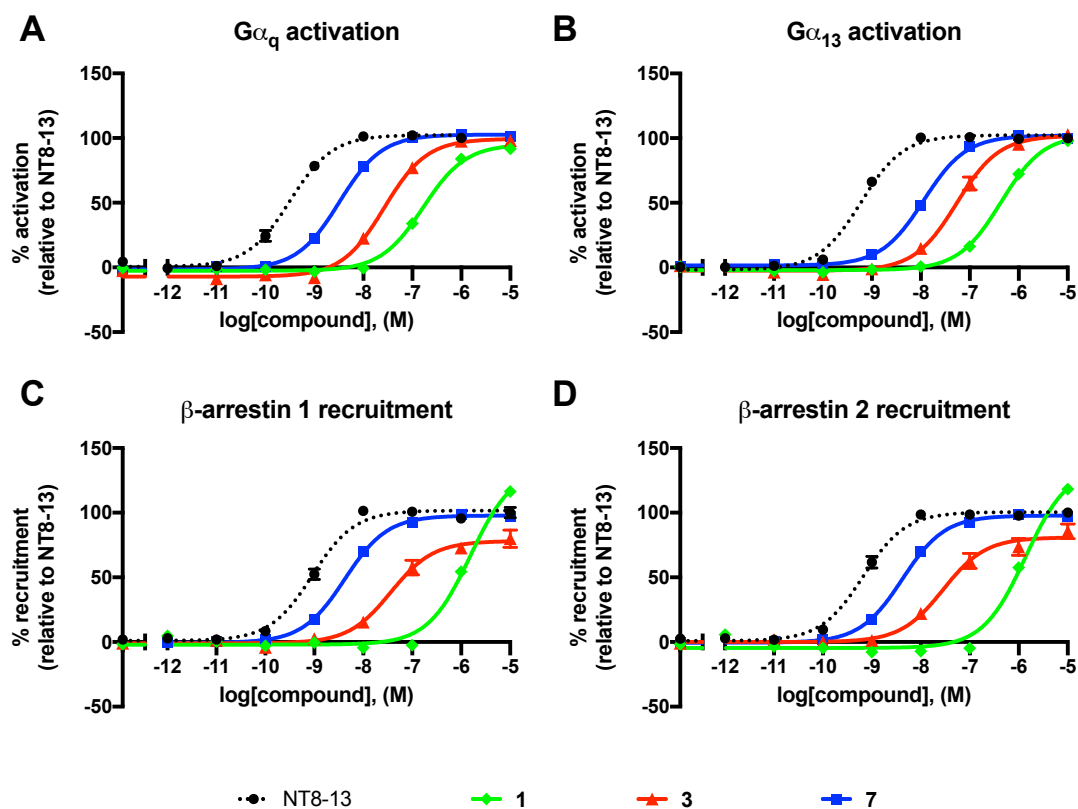


FIGURE 4.6 – *In vitro* signaling profiles of macrocycles **1**, **3** and **7**. Activation of $G_{\alpha q}$ (A) and $G_{\alpha 13}$ (B) proteins and recruitment of β -arrestins 1 (C) and 2 (D) to the hNTS1 receptor in response to compound stimulation, as monitored by BRET-based biosensors in transiently-transfected CHO cells. Assays were performed three times, in triplicate. Error bars represent mean \pm SEM.

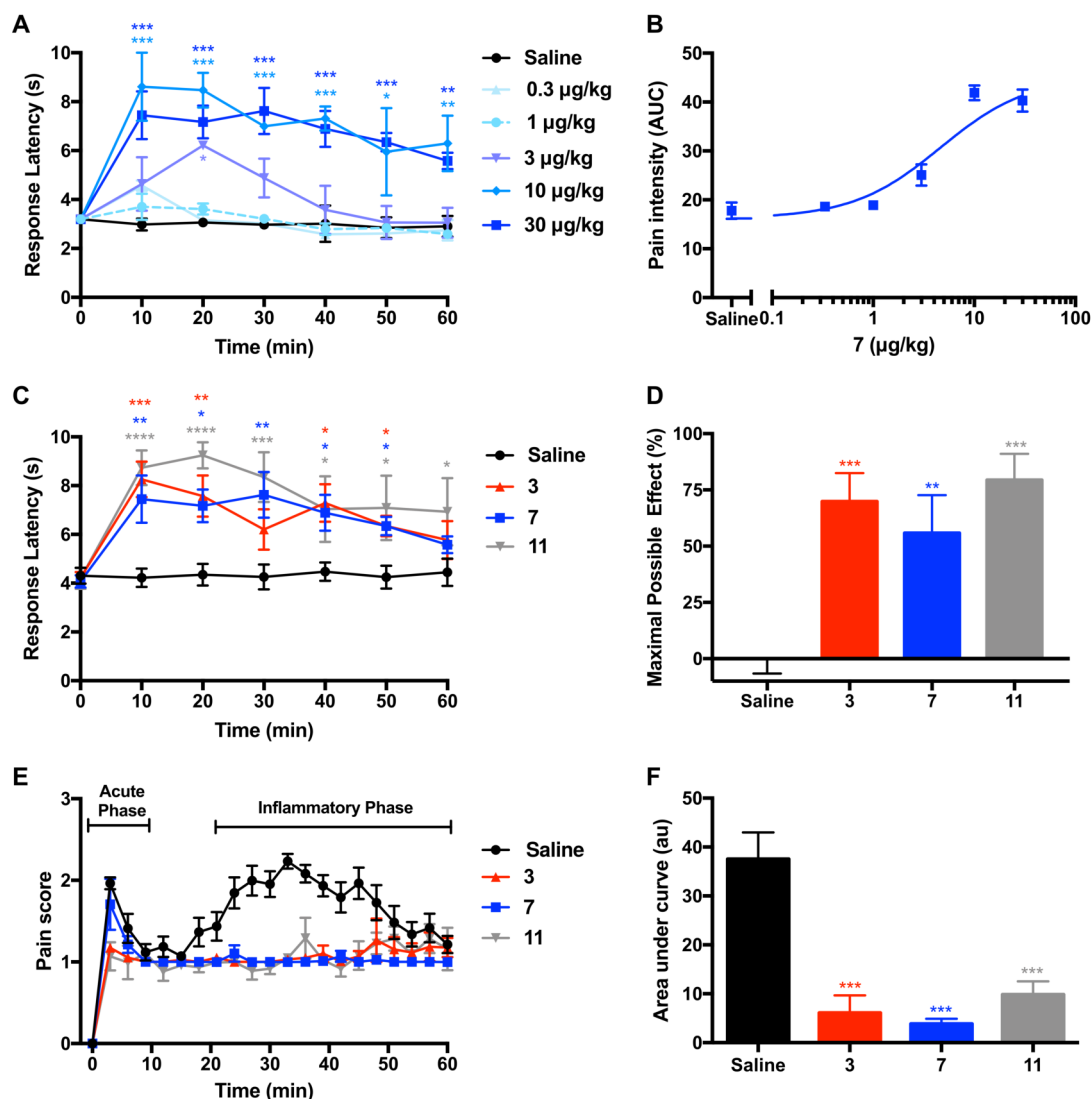


FIGURE 4.7 – Analgesic efficacy of neurotensinergic agonists on acute and tonic pain. (A) Dose-response curve of compound **7** in the acute thermal tail-flick test. Tail-flick latencies were measured each 10 min for up to 60 min following i.t. injection of **7** at different doses. (B) Calculation of area under the curve (AUC) for each dose allowed to determinate the half maximal effective dose (ED₅₀) of macrocycle **7** to induce analgesia in acute pain. (C) Antinociceptive effect of compound **3**, **7** and **11** (30 µg/kg) in acute pain. (D) Percentage of Maximal Possible Effect (% MPE) was calculated at 10 min post injection, when the antinociceptive response is maximal. (E-F) Antinociceptive effects of compound **3**, **7** and **11** (30 µg/kg) were evaluated in the formalin-induced tonic pain assay. (E) Time course of analgesic effects of compounds in acute and inflammatory phases. (F) To statistically determine the analgesic effect of each compound, AUC (au = arbitrary unit) was calculated for all the test. Dose-response curve, acute pain, n=6-8 rats for each compound, tonic pain, n=4-7 rats for each compound. Error bars represent mean \pm SEM. A two-way ANOVA followed by Tukey's correction (A and C) and a one-way ANOVA followed by Dunnet correction (D and F) were performed. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; as compared to saline-injected rats.

of 1.96 $\mu\text{g/kg}$. 60 minutes after i.t. injection, **3**, **7** and **11** all induced a temperature drop superior to 2°C (Figure 4.8C).

Monitoring arterial blood pressure after i.v. injection of each compound at 10 $\mu\text{g/kg}$ showed a characteristic triphasic response (Figure 4.8D). The first phase is a short drop (about -25 mmHg) rapidly followed by a swift return to baseline level (second phase) before a sustained depression (third phase). Tested compounds gave superimposable responses for phases 1 and 2, but blood pressure slowly returned towards baseline in phase 3 for **3** and **7**, whereas the drop induced by **11** was more sustained.

Conclusions. In conclusion, we used rational design to improve upon our previously reported macrocycle template. These new macrocyclic NT analogues showing improved binding affinity induce potent analgesia and are on par with the reference NTS1 agonist PD149163. Furthermore, these newly discovered macrocycles are full agonists on the $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 13}$ and β -Arrestin 1 and 2 signaling pathways and possess moderately to greatly improved stability in plasma. They also demonstrated good efficacy in two rodent pain models as well as similar profiles compared to the reference agonist with respect to hypothermia and hypotension. Future studies will focus on better understanding the degradation mechanisms of these compounds in order to further improve their stability, and to optimize their ability to cross barriers to ultimately reach oral and hopefully central bioavailability. It was recently suggested that NT analogues with longer half-life could even be orally bioavailable owing to active transport via NT receptors expressed on the surface of intestinal epithelial cells.⁵⁶

Future directions in research on pain will require to develop NTS2-selective analogues, since NTS1 was recently reported as the sole receptor responsible for the peripheral effects of NT, such as hypotension and hypothermia.^{10,55}

4.3 Experimental Section

4.3.1 Peptide Synthesis

Peptides were synthesized using standard Fmoc chemistry on 2-chlorotrityl resin (loading : 0.75 mmol/g) obtained from Chem Impex or Matrix Innovation. Fmoc-protected amino-acids and coupling reagents were purchased from the same manufacturers in the highest purity available, and were used as received. Peptide synthesis was performed in 12 mL polypropylene cartridge with 20 μm PE frit from Applied Separations (USA), with orbital shaking at 140 rpm. All quantities given below are for 100 μmol of peptide (130 mg of

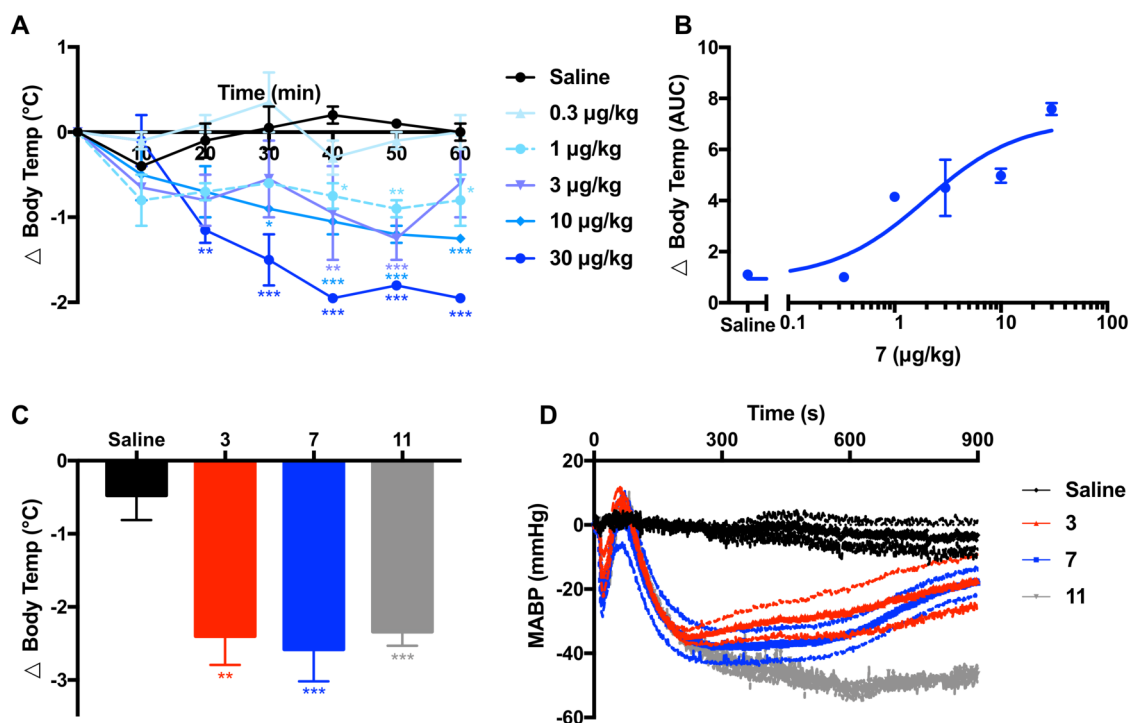


FIGURE 4.8 – Effect of **3**, **7** and **11** on body temperature and blood pressure. (A) Dose-response curve of **7** on body temperature. Change of body temperature (Δ Body Temp) was calculated every 10 min for up to 60 min following i.t. injection of compound **7** at different concentrations. (B) Calculation of AUC for each concentration leading to the determination of the ED_{50} of compound **7** to induce hypothermia. (C) Hypothermic effect of compound **3**, **7** and **11** 1h after their i.t. administration at 30 $\mu\text{g/kg}$. (D) Effect of intravenous injection (i.v.) of compound **3**, **7** and **11** at 0.01 mg/kg on blood pressure. Blood pressure changes (ΔMABP) were measured continuously every second over 15 min following i.v. injection. 16 rats for each compound. Error bars represent mean \pm SEM. A two-way ANOVA followed by Tukey's correction (A) and a one-way ANOVA followed by Dunnet correction (C) were performed. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; as compared to saline-injected rats.

resin).

Purity of all compounds mentioned herein was >95% as assessed by UPLC.

Other chemical reagents as well as compound **11** were purchased from Sigma-Aldrich.

4.3.1.1 Coupling of the first amino acid to the resin

The resin was swelled in DCM for 15 min, then stirred for 30 min with 1.5 mL of a DCM solution containing 5 eq of the Fmoc-protected amino-acid and DIEA (104 μ L, 6 eq). The resin was washed with DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), and DCM (2 \times 5 mL). Unreacted sites were capped by stirring 30 min with 1.5 mL of a DCM/MeOH/DIEA (7 :2 :1) solution and the resin was washed again as mentioned above.

4.3.1.2 Fmoc Deprotection

Fmoc groups were removed by treating the resin with a 20% piperidine/DMF solution (2 \times 10 min). The resin was then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL) and DMF (2 \times 5 mL).

4.3.1.3 Coupling of commercial amino-acids

The resin was treated with a solution of Fmoc-protected amino acid (0.5 mmol, 5 eq), HATU (95 mg, 0.5 mmol, 5 eq) and DIEA (104 μ L, 0.6 mmol, 6 eq) in DMF (1.5 mL) for 30 min, then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL) and DMF (2 \times 5 mL).

4.3.1.4 Coupling of non-commercial or costly amino-acids

The resin was treated with a solution of Fmoc-amino-acid (0.2 mmol, 2 eq), HATU (38 mg, 0.2 mmol, 2 eq) and DIEA (52 μ L, 0.3 mmol, 3 eq) in DMF (1.5 mL) for 2 h, then washed with DMF (2 \times 5 mL), DCM (2 \times 5 mL), *i*PrOH (2 \times 5 mL), and DCM (2 \times 5 mL). The procedure was repeated if the resin beads turned blue when submitted to the Kaiser test.

4.3.1.5 On-resin Nosylation of amines

2-nitrobenzenesulfonyl chloride (89 mg, 0.4 mmol, 4 eq) and 2,4,6-trimethylpyridine (132 μ L, 1 mmol, 10 eq) were dissolved in NMP (1.5 mL). This solution was poured into the reactor containing the resin-bound free-amine peptide. After 30 minutes stirring, the solution was filtered off and this step was repeated once or until the Kaiser test returned

negative. The resin was then washed with NMP (2×5 mL), DCM (2×5 mL), *i*PrOH (2×5 mL), DCM (2×5 mL) and DMF (2×5 mL).

4.3.1.6 Kaiser test⁵⁷

The completion of amino-acid couplings and nosylations were assessed by transferring a few resin beads in a 6×50 mm glass culture tube, then adding one drop of 0.2 mM KCN in pyridine/H₂O (98 :2), one drop of 5% ninhydrin in *n*-butanol and one drop of 20 M phenol in *n*-butanol. Upon heating of the mixture, the beads turn blue if free amines remain.

4.3.1.7 Acetylation of Tyrosine

The resin was stirred for one hour with acetic anhydride (19 μ L, 0.2 mmol, 2 eq) and DIEA (35 μ L, 0.2 mmol, 2 eq) in DCM (1.5 mL). This step was repeated once or until reaction completion was confirmed by UPLC-MS (after cleavage of a small amount of resin with DCM/TFA/TiS 99 : 0.5 : 0.5). The resin was then washed with DMF (2×5 mL), DCM (2×5 mL), *i*PrOH (2×5 mL), DCM (2×5 mL) and DMF (2×5 mL).

4.3.1.8 Fukuyama-Mitsunobu Reaction

Triphenylphosphine (131 mg, 0.5 mmol, 5 eq) and the alcohol (1 mmol, 10 eq) were dissolved in anhydrous THF (1.5 mL) and this solution was poured into the reactor containing the resin-bound peptide. DIAD (98 μ L, 0.5 mmol, 5 eq) was added and the mixture was stirred for 30 min. The solution was filtered off and this step was repeated once or until reaction completion was confirmed by UPLC-MS (after cleavage of a small amount of resin with DCM/TFA/TiS 99 : 0.5 : 0.5). The resin was then washed with THF (2×5 mL), DCM (2×5 mL), *i*PrOH (2×5 mL), DCM (2×5 mL) and DMF (2×5 mL).

4.3.1.9 Ring-Closing Metathesis

The dried resin, Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst (12.5 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq) and *p*-benzoquinone (11 mg, 0.1 mmol, 1 eq) were placed in a microwave tube which was then purged with argon. Anhydrous DCE (1.5 mL) was added before submitting the mixture to microwave irradiation (50°C, 60 min). The resin was then washed with DCM (5×5 mL).

4.3.1.10 Simultaneous Nosyl and Acetyl deprotection

2-mercaptoethanol (70 μ L, 1 mmol, 10 eq) and DBU (74 μ L, 0.5 mmol, 5 eq) were dissolved in NMP (1.5 mL) and the solution was poured in the reactor containing the resin-bound

peptide. After 30 minutes stirring, the solution was filtered off and this step was repeated once. The resin was then washed with NMP (2×5 mL), DCM (2×5 mL), *i*PrOH (2×5 mL), DCM (2×5 mL) and DMF (2×5 mL).

4.3.1.11 Cleavage from the resin and side-chain deprotection

The resin was transferred to a 20 mL glass vial and stirred for 1 h with 3 mL of a TFA/DCM/TiS (50 :49 :1) solution. The peptide was then precipitated in 20 mL of cold *t*BME, centrifuged (3000 rpm, 15 min, 4°C), then dried in vacuo.

4.3.1.12 Peptide Purification

The crude product was dissolved in water/acetonitrile (7 :3) and purified on a preparative HPLC-MS system from Waters (column XSELECT CSH Prep C18 (19 x 100 mm) packed with 5 μ m particles, UV detector 2998, MS SQ Detector 2, Sample manager 2767 and a binary gradient module) using acetonitrile and water + 0.1 % formic acid as eluents. Purified fractions were then lyophilized and the purity of obtained compounds was assessed on an UPLC-MS system (column Acquity UPLC® CSH C18 (2.1 x 50 mm) packed with 1.7 μ m particles) with the following gradient : acetonitrile and water with 0.1% TFA (0→0.2 min : 5% acetonitrile; 0.2→1.5 min : 5%→95%; 1.5→1.8 min : 95%; 1.8→2.0 min : 95%→5%; 2.0→2.5 min : 5%). In general, *E* and *Z* isomers did not separate. High resolution mass spectra of all analogues were obtained using electrospray infusion ESI-Q-Tof from maXis.

4.3.1.13 Synthesis of unnatural amino acid derivatives

Fmoc-aminohexanoic acid : 6-aminohexanoic acid (1 g, 7.5 mmol) was dissolved into 20 mL water. Sodium bicarbonate (1.3 g, 15.2 mmol, 2eq) was added. Fmoc-Cl (2.3 g, 9.1 mmol, 1.2 eq) was dissolved into 15 mL dioxane and this solution was added to the mixture. After 4h stirring, dioxane was evaporated in vacuo and the aqueous phase was washed with diethyl ether. Its pH was then adjusted to 2 by addition of 1N HCl and the product was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated in vacuo. The product was purified by flash chromatography to give 1.8 g of a yellow oil (72 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 7.74 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.5, 2H), 7.29 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 4.39 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.19 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.18 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.64 (dt, J = 14.9, 7.5 Hz, 2H), 1.51 (dt, J = 14.6, 7.3, 2H), 1.35 (dt, J = 14.7, 7.4, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) : δ 177.73, 143.82, 141.17, 127.5, 126.86, 124.86, 119.81, 66.35, 47.14, 40.62, 33.40, 29.46, 25.94, 24.09.

Fmoc-Tyr-*o*-Allyl-OH was synthesized as described previously.⁴⁴

4.3.1.14 Docking

All modelling was done using MOE.⁵⁰ Macrocycles **1** and **7** were built using MOE's builder, minimized, protonated and partial charges were calculated. Conformational search with the "Conformational Search" module were carried out on the Z and E isomers independently using MMFF94x as forcefield and the LowModeMD as a method, performing molecular dynamics perturbations along low frequency vibrational mode. Rejection limit was fixed to 100, iteration limit to 10 000, RMS gradient to 0.005 and MM iteration limit to 500. Two conformations were judged equal if the optimal heavy atom RMS superposition distance was less than 0.25 Å. The conformations obtained were then docked into a hNTS1 homology model (built from rNTS1 X-ray structure with pdb id 4grv²⁸ using MOE's tools).

4.3.2 In vitro assays

4.3.2.1 Competitive Radioligand Binding Assay on the hNTS1 receptor

CHO-K1 cells stably expressing hNTS1 (ES-690-C from PerkinElmer, Montréal, Canada) were cultured in DMEM F12 culture medium at 37°C in a humidified chamber under 5% CO₂. Culture media were supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 20 mM HEPES, and 0.4 mg/mL G418.

The cells were frozen when they reached 80% confluency. They were scrapped off the dish with 10 mM Tris buffer, 1 mM EDTA, pH 7.5 and centrifuged at 15,000 g for 5 min at 4°C. The pellet was then re-suspended in binding buffer. Competitive radioligand binding experiments were performed by incubating 15 µg of cell membranes expressing the hNTS1 receptor with 45 pM of ¹²⁵I-[Tyr³]-NT (2200 Ci/mmol, purchased from PerkinElmer, Billerica, MA) in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2% BSA) in the presence of increasing concentrations of analogues ranging from 10⁻¹¹ to 10⁻⁴ M for 60 min at 25°C. After incubation, the binding reaction mixture was transferred in PEI-coated 96-well filter plates (glass fiber filters GF/B, Millipore, Billerica, MA). Reaction was terminated by filtration, and plates were washed three times with 200 µL ice-cold binding buffer. Glass filters were then counted using a γ-counter (2470 Wizard2, PerkinElmer, Mississauga, Ontario, Canada). Non-specific binding was measured in the presence of 10⁻⁵ M unlabeled NT (8-13) and represented less than 5% of total binding. IC₅₀ values were determined from competition curves as the unlabeled ligand concentration inhibiting 50% of ¹²⁵I-[Tyr³]-NT-specific binding. Competitive radioligand binding data were

plotted using Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA) using the One-site-Fit Log(IC₅₀) and represented the mean \pm SEM of at least three separate experiments.

4.3.2.2 BRET Assays

CHO-K1 cells were cultured in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 20 mM HEPES at 37°C in a humidified chamber at 5% CO₂. Cells were seeded into T75 flasks at a density of 20 000 cells/cm²; 24 h later, cells were transfected with plasmids coding for hNTS1-GFP10/RlucII- β -arrestin1 or hNTS1-GFP10/RlucII- β -arrestin2, or with hNTS1/G α_q -RlucII/G β 1/GFP10-G γ 1 or hNTS1/G α_{13} -RlucII/G β 1/GFP10-G γ 1 using PEI.

Cells were transferred into 96-well plates at a concentration of 50 000 cells/well 24 h after transfection and incubated at 37°C overnight. They were then washed with PBS and 90 μ L HBSS was added in each well. Cells were then stimulated with increasing concentrations of each analog ranging from 10⁻¹¹ to 10⁻⁵ M (10⁻¹² to 10⁻⁶ M in the case of NT (8-13)) for 20 min (β -arrestin 1 & 2) or 5 min (G α_q and G α_{13}) at 37°C. After stimulation, coelenterazine 400A was added in each well to a final concentration of 5 μ M and the plate was read using filter selected for BRET2 measurement on a Mithras 2 plate reader (Berthold Technologies, Tennessee, USA). BRET2 ratio was determined as GFP10em/RlucIIem. Data were analyzed using GraphPad Prism 7, normalization was done by using the BRET2 ratio of nonstimulated cells as 0% and the ratio of cells stimulated with 10⁻⁶ M NT (8-13) as 100% activation. EC₅₀ values were determined using the dose response-stimulation log(agonist) vs response (three parameters) and represent the mean \pm SEM of at least three separate experiments, each performed in triplicate.

4.3.2.3 Plasma Stability Assay

Rat plasma was obtained by centrifugation of rat blood (13000 rpm, 5 min, 4°C). 6 μ L of a 1 mM aqueous solution (10% DMSO) of peptide were incubated with 27 μ L of rat plasma at 37°C for 5, 10, 30 and 60 min (1, 3 and 5 min for NT (8-13)). Proteolytic degradation was quenched by adding 70 μ L of acetonitrile/ethanol (1 :1), 0.5% nicotinamide solution and vortexing. Samples were centrifuged (13000 rpm, 5 min, 4°C) and the supernatant was filtered on a 4 mm nylon 0.2 μ m syringe filter and analyzed by UPLC-MS (Waters 2695 with ACE C18 column 2.0 \times 100 mm, 2.7 μ m spherical particle size and Electrospray micromass ZQ-2000 from Waters). Data were analyzed using GraphPad Prism 7's one phase decay equation.

4.3.3 *In Vivo Analgesic Assays*

Animals, Housing, and Habituation. Experiment were performed with adult male Sprague-Dawley rats, weighing 225-300 g (Charles River laboratories, St-Constant, Canada). Rats were housed two per cage on Aspen shavings in a quiet room and kept on a 12 h light/dark cycle and allowed ad libitum access to food and water. The experimental procedures in this study were approved by the Animal Care Committee of Université de Sherbrooke and were in accordance with policies and directives of the Canadian Council on Animal Care.

Intrathecal Administration. Rats were lightly anesthetized with isoflurane/oxygen (Baxter corporation, Mississauga, ON, Canada; 2 L/min) flow and injected intrathecally at the L5-L6 intervertebral space with either 30 µg/kg of tested compound diluted in 0.9% saline or 0.9% saline alone.

Tail flick test. The tail flick test was used as outcome measures heat-induced pain in animals and as indicators of a compound's analgesic efficacy.

Acute pain was assessed using the Tail flick test (Tail Flick Analgesia meter V2.00, Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA). Tail flick test measures sensitivity to a high-intensity light beam focused on the rat tail. The tail flick apparatus was set at a light intensity of 6 and a cutoff of 10 seconds. The latency, in seconds, to flick the tail out of the path of the light beam corresponds to the measure of pain sensitivity or analgesia.

Before testing, animals were individually acclimatized to manipulations and behavioral apparatus 5 min/day for three consecutive days. On the test day, latencies baseline measures were taken before drug injection to provide a mean baseline.

Compounds **3**, **7** and **11** were diluted in 0.9% saline and injected at the same dose of 30 µg/kg. The effects of compounds or saline on thermal nociception were assessed every 10 min for up to 60 min following i.t. administration.

Tail flick latencies were converted into the percent maximal possible effect (% MPE) at the time of maximal peak of analgesia. % MPE were calculated according to the following formula : $\%MPE = \frac{(\text{test latency}) - (\text{saline latency})}{(\text{cutoff}) - (\text{saline latency})} \times 100$. Data are expressed as mean \pm SEM of 6-8 animals for each different compound.

Formalin test : The analgesic effect of compounds **3**, **7** and **11** was assessed using the formalin test as a model of persistent pain. 5 minutes after intrathecal injection of com-

pounds at 30 µg/kg, the rats received a 50 µl of diluted 2% formaldehyde (i.e 5% formalin; Bioshop, Burlington, Ontario) into the plantar surface of the right hind paw. Rats were then placed in clear plastic chambers (30 x 30 x 30 cm) positioned over a mirror angled at 45° in order to allow an unobstructed view of the paws and their behaviors were observed for the next 60 min. An intraplantar injection of formalin produced the biphasic nociceptive response typical of this tonic pain model.⁵⁸ The two distinct phases of spontaneous pain behaviors that occur in rodents are proposed to reflect a direct effect of formalin on sensory receptors (acute phase) and a longer lasting pain due to inflammation and central sensitization (inflammatory phase). Nociceptive behaviors were assessed using a weighted score as described previously.^{59,60} Following injection of formalin into the hind paw, nociceptive mean score was determined for each 3-min block during 60 min by measuring the amount of time spent in each of four behavioral categories : 0, the injected paw is comparable to the contralateral paw ; 1, the injected paw has little or no weight placed on it; 2, the injected paw is elevated and is not in contact with any surface; 3, the injected paw is licked, bitten, or shaken.⁶⁰ The behaviors believed to represent higher levels of pain intensity were given higher weighted scores. The weighted average pain intensity score ranging from 0 to 3 was then calculated by multiplying the time spent in each category by the category weight, summing these products, and dividing by the total time in a given time interval. The pain score was thus calculated from the following formula $\frac{1 \times T1 + 2 \times T2 + 3 \times T3}{180}$ where T1, T2, and T3 are the durations (in seconds) spent in behavioral categories 1, 2, or 3, respectively, during each 180 second block. The Area Under the Curve (AUC) was calculated during all the duration of the test (0-60 min).

Body temperature : Body temperature was measured using a thermistor probe inserted into the rectum of adult Sprague-Dawley rats. Animals were individually acclimatized to manipulations and thermistor probe 5 min/day for three consecutive days. On the test day, temperatures were measured before (baseline) and each 10 min for up to 60 min following intrathecal drug administration of compounds. Compound **7** was dissolved in 0.9% of saline and injected at different concentrations (0.3, 1, 3, 10 and 30 µg/kg). Compounds **3** and **11** were injected at 30 µg/kg (dissolved in 0.9% saline) and the body temperature was measured only at 60 min following i.t. injection. Changes in body temperature (Δ body temp) were determined from baseline for each time and each animal.

Blood pressure measurement : Rats were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (87 mg/kg : 13 mg/kg, i.m) and placed in supine position on a heating pad. Mean, systolic

and diastolic arterial blood pressure and a heart rate were measured through a catheter (PE 50 filled with heparinized saline) inserted in the right carotid artery and connected to a Micro-Med transducer (model TDX-300, USA) linked to a blood pressure Micro-Med analyzer (model BPA-100c). Another catheter (PE 10 filled with heparinized saline) was inserted in the left jugular vein for injections of test compounds at 0.01 mg/kg (volume 1 mL/kg, 5–10 s) or 0.9% saline. Blood pressure was recorded each second for up to 900 seconds following intravenous injection. Changes in mean arterial blood pressure (Δ MABP) were determined from the basal pressure of rat. Data represents the mean \pm SEM of 2-4 rats for each condition.

Statistical analysis : Data are expressed as mean \pm standard errors of the mean (SEM). All graphs and statistical analysis were performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). A two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used to determine the significant differences in tail-flick latencies and changes in body temperature (Δ body temp) between different concentrations of compound **7** and saline (Fig 4.7A and 4.8A) or between drug and saline (Fig 4.7C). The % MPE, the AUC for the formalin test and the δ body temp at 60 min post-injection were analyzed using an one-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparison test to compare drug and saline treatment. A difference in response was considered significant with p-values * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. To determine the half maximal effective dose (ED_{50}) of compound **7**, the AUC was calculated for each concentration in tail-flick and hypothermia test. Then, ED_{50} values were determined using the dose-response-stimulation log(agonist) vs response (three parameters).

4.4 References

- (1) Bodnar, R. J. Endogenous Opiates and Behavior : 2015. *Peptides* **2017**, 88 (12), 126–188.
- (2) Kennedy, J. D. Neuropathic Pain : Molecular Complexity Underlies Continuing Unmet Medical Need. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (11), 2547–2556.
- (3) Trang, T. ; Al-Hasani, R. ; Salvemini, D. ; Salter, M. W. ; Gutstein, H. ; Cahill, C. M. Pain and Poppies : The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *J. Neurosci.* **2015**, 35 (41), 13879–13888.
- (4) Carraway, R. ; Leeman, S. E. The Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, from Bovine Hypothalami. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248 (19), 6854–6861.
- (5) Vincent, J. P. ; Mazella, J. ; Kitabgi, P. Neurotensin and Neurotensin Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 20 (7), 302–309.
- (6) Patrycja, P. K. ; Lipkowski, A. W. Neurotensin and Neurotensin Receptors : Characteristic, Structure-Activity Relationship and Pain Modulation -A Review. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 1–7.
- (7) Clineschmidt, B. V ; McGuffin, J. C. Neurotensin Administered Intracisternally Inhibits Responsiveness of Mice to Noxious Stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* **1977**, 46 (4), 395–396.
- (8) Nemeroff, C. B. ; Osbahr, A. J. ; Manberg, P. J. ; Ervin, G. N. ; Prange, A. J. Alterations in Nociception and Body Temperature after Intracisternal Administration of Neurotensin, Beta-Endorphin, Other Endogenous Peptides, and Morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, 76 (10), 5368–5371.
- (9) Roussy, G. ; Dansereau, M.-A. ; Doré-Savard, L. ; Belleville, K. ; Beaudet, N. ; Richelson, E. ; Sarret, P. Spinal NTS1 Receptors Regulate Nociceptive Signaling in a Rat Formalin Tonic Pain Model. *J. Neurochem.* **2008**, 105 (4), 1100–1114.
- (10) Tétreault, P. ; Beaudet, N. ; Perron, A. ; Belleville, K. ; René, A. ; Cavelier, F. ; Martinez, J. ; Stroh, T. ; Jacobi, A. M. ; Rose, S. D. ; et al. Spinal NTS2 Receptor Activation Reverses Signs of Neuropathic Pain. *FASEB J.* **2013**, 27 (9), 3741–3752.
- (11) Clineschmidt, B. V. ; McGuffin, J. C. ; Bunting, P. B. Neurotensin : Antinocisponsive Action in Rodents. *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, 54 (1–2), 129–139.
- (12) Glimcher, P. W. ; Margolin, D. H. ; Giovino, A. A. ; Hoebel, B. G. Neurotensin : A New “Reward Peptide”. *Brain Res.* **1984**, 291 (1), 119–124.
- (13) Binder, E. B. ; Kinkead, B. ; Owens, M. J. ; Nemeroff, C. B. Neurotensin and Dopamine Interactions. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53 (4), 453–486.
- (14) Barroso, S. ; Richard, F. ; Nicolas-Ethève, D. ; Reversat, J. L. ; Bernassau, J. M. ; Kitabgi, P. ; Labbé-Jullié, C. Identification of Residues Involved in Neurotensin Binding and Modeling of the Agonist Binding Site in Neurotensin Receptor 1. *J. Biol. Chem.* **2000**,

275 (1), 328–336.

(15) Checler, F.; Vincent, J. P.; Kitabgi, P. Neurotensin Analogs [D-TYR11] and [D-PHE11]neurotensin Resist Degradation by Brain Peptidases in Vitro and in Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1983**, 227 (3), 743–748.

(16) Wustrow, D. J.; Davis, M. D.; Akunne, H. C.; Corbin, A. E.; Wiley, J. N.; Wise, L. D.; Heffner, T. G. Reduced Amide Bond Neurotensin 8–13 Mimetics with Potent in Vivo Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5 (9), 997–1002.

(17) Smith, K. E.; Boules, M.; Williams, K.; Richelson, E. NTS1 and NTS2 Mediate Analgesia Following Neurotensin Analog Treatment in a Mouse Model for Visceral Pain. *Behav. Brain Res.* **2012**, 232 (1), 93–97.

(18) Fanelli, R.; Besserer-Offroy, É.; René, A.; Côté, J.; Tétreault, P.; Colletette-Tremblay, J.; Longpré, J.-M.; Leduc, R.; Martinez, J.; Sarret, P.; et al. Synthesis and Characterization in Vitro and in Vivo of (L)-(Trimethylsilyl)alanine Containing Neurotensin Analogues. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (19), 7785–7795.

(19) Tyler, B. M.; Douglas, C. L.; Fauq, a; Pang, Y. P.; Stewart, J. a; Cusack, B.; McCormick, D. J.; Richelson, E. In Vitro Binding and CNS Effects of Novel Neurotensin Agonists That Cross the Blood-Brain Barrier. *Neuropharmacology* **1999**, 38 (7), 1027–1034.

(20) Boules, M.; Fredrickson, P.; Richelson, E. Current Topics : Brain Penetrating Neurotensin Analog. *Life Sci.* **2003**, 73 (22), 2785–2792.

(21) Luca, S.; White, J. F.; Sohal, A. K.; Filippov, D. V; van Boom, J. H.; Grisshammer, R.; Baldus, M. The Conformation of Neurotensin Bound to Its G Protein-Coupled Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100 (19), 10706–10711.

(22) Khatun, U. L.; Goswami, S. K.; Mukhopadhyay, C. Modulation of the Neurotensin Solution Structure in the Presence of Ganglioside GM1 Bicelle. *Biophys. Chem.* **2012**, 168–169, 48–59.

(23) Da Costa, G.; Bondon, A.; Coutant, J.; Curmi, P.; Monti, J.-P. Intermolecular Interactions between the Neurotensin and the Third Extracellular Loop of Human Neurotensin 1 Receptor. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, No. November, 37–41.

(24) Pang, Y. P.; Cusack, B.; Groshan, K.; Richelson, E. Proposed Ligand Binding Site of the Transmembrane Receptor for neurotensin(8-13). *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (25), 15060–15068.

(25) Bittermann, H.; Einsiedel, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P. Evaluation of Lactam-Bridged Neurotensin Analogues Adjusting psi(Pro10) close to the Experimentally Derived Bioactive Conformation of NT(8-13). *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (22), 5587–5590.

(26) Einsiedel, J.; Hübner, H.; Hervet, M.; Härterich, S.; Koschätzky, S.; Gmeiner, P. Peptide Backbone Modifications on the C-Terminal Hexapeptide of Neurotensin. *Bioor-*

ganic Med. Chem. Lett. **2008**, 18 (6), 2013–2018.

(27) White, J. F.; Noinaj, N.; Shibata, Y.; Love, J.; Kloss, B.; Xu, F.; Gvozdenovic-Jeremic, J.; Shah, P.; Shiloach, J.; Tate, C. G.; et al. Structure of the Agonist-Bound Neurotensin Receptor. *Nature* **2012**, 490 (7421), 508–513.

(28) Egloff, P.; Hillenbrand, M.; Klenk, C.; Batyuk, A.; Heine, P.; Balada, S.; Schlinkmann, K. M.; Scott, D. J.; Schütz, M.; Plückthun, A. Structure of Signaling-Competent Neurotensin Receptor 1 Obtained by Directed Evolution in Escherichia Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, 111 (6), E655–62.

(29) Lee, S.; Bhattacharya, S.; Tate, C. G.; Grisshammer, R.; Vaidehi, N. Structural Dynamics and Thermostabilization of Neurotensin Receptor 1. *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119 (15), 4917–4928.

(30) Krumm, B. E.; Lee, S.; Bhattacharya, S.; Botos, I.; White, C. F.; Du, H.; Vaidehi, N.; Grisshammer, R. Structure and Dynamics of a Constitutively Active Neurotensin Receptor. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 38564.

(31) Akunne, H. C.; Darling, S.; Zoski, K.; Seffler, A. M.; He, J. X.; Sawyer, T. K.; Pugsley, T. A.; Cody, W. L. Functional Activity of New C-Terminal Cyclic-Neurotensin Fragment Analogs. *Neuropeptides* **1996**, 30 (3), 213–218.

(32) Van Kemmel, F. M.; Dubuc, I.; Bourdel, E.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Costentin, J. A C-Terminal Cyclic 8-13 Neurotensin Fragment Analog Appears Less Exposed to Neprilysin When It Crosses the Blood-Brain Barrier than the Cerebrospinal Fluid-Brain Barrier in Mice. *Neurosci. Lett.* **1996**, 217 (1), 58–60.

(33) Bredeloux, P.; Cavelier, F.; Dubuc, I.; Vivet, B.; Costentin, J.; Martinez, J. Synthesis and Biological Effects of c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (JMV2012), a New Analogue of Neurotensin That Crosses the Blood-Brain Barrier. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (6), 1610–1616.

(34) Lundquist, J. T.; Dix, T. A. Preparation and Receptor Binding Affinities of Cyclic C-Terminal Neurotensin (8-13) and (9-13) Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9 (17), 2579–2582.

(35) Marsault, É.; Peterson, M. L. Practical Medicinal Chemistry with Macrocycles : Design, Synthesis, and Case Studies; Marsault, É., Peterson, M. L., Eds.; Wiley, **2017**.

(36) Marsault, E.; Peterson, M. L. Macrocycles Are Great Cycles : Applications, Opportunities, and Challenges of Synthetic Macrocycles in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (7), 1961–2004.

(37) Yudin, A. K. Macrocycles : Lessons from the Distant Past, Recent Developments, and Future Directions. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (1), 30–49.

(38) Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. The Exploration of Macrocycles

for Drug Discovery—an Underexploited Structural Class. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (7), 608–624.

(39) Glas, A. ; Wamhoff, E.-C. ; Krüger, D. M. ; Rademacher, C. ; Grossmann, T. N. Increased Conformational Flexibility of a Macrocyclic-Receptor Complex Contributes to Reduced Dissociation Rates. *Chemistry* **2017**, 23 (64), 16157–16161.

(40) Beck, J. G. ; Chatterjee, J. ; Laufer, B. ; Kiran, M. U. ; Frank, A. O. ; Neubauer, S. ; Ovadia, O. ; Greenberg, S. ; Gilon, C. ; Hoffman, A. ; et al. Intestinal Permeability of Cyclic Peptides : Common Key Backbone Motifs Identified. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (29), 12125–12133.

(41) Pérez de Vega, M. J. ; García-Aranda, M. I. ; González-Muñiz, R. A Role for Ring-Closing Metathesis in Medicinal Chemistry : Mimicking Secondary Architectures in Bioactive Peptides. *Med. Res. Rev.* **2010**, 31 (5), 677–715.

(42) Blackwell, H. E. ; Sadowsky, J. D. ; Howard, R. J. ; Sampson, J. N. ; Chao, J. A. ; Steinmetz, W. E. ; O’Leary, D. J. ; Grubbs, R. H. Ring-Closing Metathesis of Olefinic Peptides : Design, Synthesis, and Structural Characterization of Macrocyclic Helical Peptides. *J. Org. Chem.* **2001**, 66 (16), 5291–5302.

(43) Brik, A. Metathesis in Peptides and Peptidomimetics. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350 (11–12), 1661–1675.

(44) Sousbie, M. ; Besserer-Offroy, É. ; Brouillette, R. L. ; Longpré, J.-M. ; Leduc, R. ; Sarret, P. ; Marsault, É. In Search of the Optimal Macrocyclization Sites for Neurotensin. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, in press.

(45) Biron, E. ; Chatterjee, J. ; Kessler, H. Optimized Selective N-Methylation of Peptides on Solid Support. *J. Pept. Sci.* **2006**, 12 (3), 213–219.

(46) Hong, S. H. ; Sanders, D. P. ; Lee, C. W. ; Grubbs, R. H. Prevention of Undesirable Isomerization during Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (49), 17160–17161.

(47) Patgiri, A. ; Menzenski, M. Z. ; Mahon, A. B. ; Arora, P. S. Solid-Phase Synthesis of Short α -Helices Stabilized by the Hydrogen Bond Surrogate Approach. *Nat. Protoc.* **2010**, 5 (11), 1857–1865.

(48) Molecular Operating Environment (MOE), 2016.0802 ; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2017**.

(49) Pettersen, E. F. ; Goddard, T. D. ; Huang, C. C. ; Couch, G. S. ; Greenblatt, D. M. ; Meng, E. C. ; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25 (13), 1605–1612.

(50) Besserer-Offroy, É. ; Brouillette, R. L. ; Lavenus, S. ; Froehlich, U. ; Brumwell, A. ; Murza, A. ; Longpré, J. M. ; Marsault, É. ; Grandbois, M. ; Sarret, P. ; et al. The Signaling Signature of the Neurotensin Type 1 Receptor with Endogenous Ligands. *Eur. J. Pharma-*

col. **2017**, 805, 1–13.

(51) Petrie, K. A.; Bubser, M.; Casey, C. D.; Davis, M. D.; Roth, B. L.; Deutch, A. Y. The Neurotensin Agonist PD149163 Increases Fos Expression in the Prefrontal Cortex of the Rat. *Neuropsychopharmacology* **2004**, 29 (10), 1878–1888.

(52) Dobner, P. R. Neurotensin and Pain Modulation. *Peptides* **2006**, 27 (10), 2405–2414.

(53) Sharpe, A. L.; Varela, E.; Beckstead, M. J. Systemic PD149163, a Neurotensin Receptor 1 Agonist, Decreases Methamphetamine Self-Administration in DBA/2J Mice without Causing Excessive Sedation. *PLoS One* **2017**, 12 (7), e0180710.

(54) Rioux, F.; Quirion, R.; St-Pierre, S.; Regoli, D.; Jolicœur, F. B.; Bélanger, F.; Barbeau, A. The Hypotensive Effect of Centrally Administered Neurotensin in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, 69 (3), 241–247.

(55) Roussy, G.; Dansereau, M.-A.; Baudisson, S.; Ezzoubaa, F.; Belleville, K.; Beaudet, N.; Martinez, J.; Richelson, E.; Sarret, P. Evidence for a Role of NTS2 Receptors in the Modulation of Tonic Pain Sensitivity. *Mol. Pain* **2009**, 5, 38–52.

(56) Bird, J. L.; Simpson, R.; Villasaliu, D.; Goddard, A. D. Neurotensin Receptor 1 Facilitates Intracellular and Transepithelial Delivery of Macromolecules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, 119, 300–309.

(57) Kaiser, E.; Colecott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, 34 (2), 595–598.

(58) Tjolsen, A.; Berge, O. G.; Hunskaar, S.; Rosland, J. H.; Hole, K. The formalin test : an evaluation of the method. *Pain* **1992**, 51 (1), 5-17

(59) Dubuisson, D.; Dennis, Stephen G. The formalin test : A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* **1977**, 4 C, 161-174

(60) Codere, T. The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol. Neurobiol.* **1993**, 7 (3-4), 229-246

5 SÉLECTIVITÉ ENVERS NTS2

5.1 Introduction

La majeure partie de la littérature scientifique disponible concernant les analogues de NT omet l'exploration de leurs effets sur le récepteur NTS2. Ceci est dû au fait que NTS2 a été identifié plus tard, mais il est aussi largement moins bien caractérisé. Non seulement au niveau structural (cinq ans après la publication de la première structure de NTS1 par cristallographie (White *et al.*, 2012b), toujours rien de similaire n'a été produit pour NTS2, par exemple), mais aussi au niveau fonctionnel : il n'existe à ce jour que très peu de données ayant permis d'identifier quelles protéines effectrices sont activées par NTS2 (Gendron *et al.*, 2004).

Cependant, les effets physiologiques de l'activation de NTS2 sont relativement bien établis. On sait maintenant que l'activation de NTS2 seul suffit à induire un effet analgésique, similaire à celui obtenu en activant NTS1 (Sarret *et al.*, 2005; Roussy *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2012). Par contre, les effets secondaires connus dus à l'activation de NTS1 (tels que l'hypotension et l'hypothermie) ne sont pas observés quand on active sélectivement NTS2 (Tétreault *et al.*, 2013). De plus, NTS2 n'est exprimé que dans le SNC, contrairement à NTS1 (Vincent *et al.*, 1999). Ceci rend NTS2 très attractif dans le contexte de développement de composés analgésiques, puisque des composés sélectifs pourraient potentiellement présenter moins d'effets indésirables que des composés non-sélectifs ou sélectifs envers NTS1.

Plusieurs composés sélectifs ont été développés dans cette optique et il semble que le résidu en position 11 de la NT (8-13) ait une importance critique pour la sélectivité. En effet, remplacer la tyrosine par un tryptophane ou une lysine induit une sélectivité vers NTS2.

Nous avons donc décidé, dans un premier temps, d'évaluer l'affinité de nos macrocycles (publiés et non-publiés) pour NTS2 afin de mieux les caractériser et d'évaluer leur sélectivité pour l'un ou l'autre des récepteurs. Dans un deuxième temps, nous avons conçu un nouveau macrocycle à partir du composé **3** du deuxième article. L'objectif était de remplacer la tyrosine par un tryptophane afin de déterminer si l'induction de sélectivité fonctionnait aussi bien sur les macrocycles que sur les peptides linéaires.

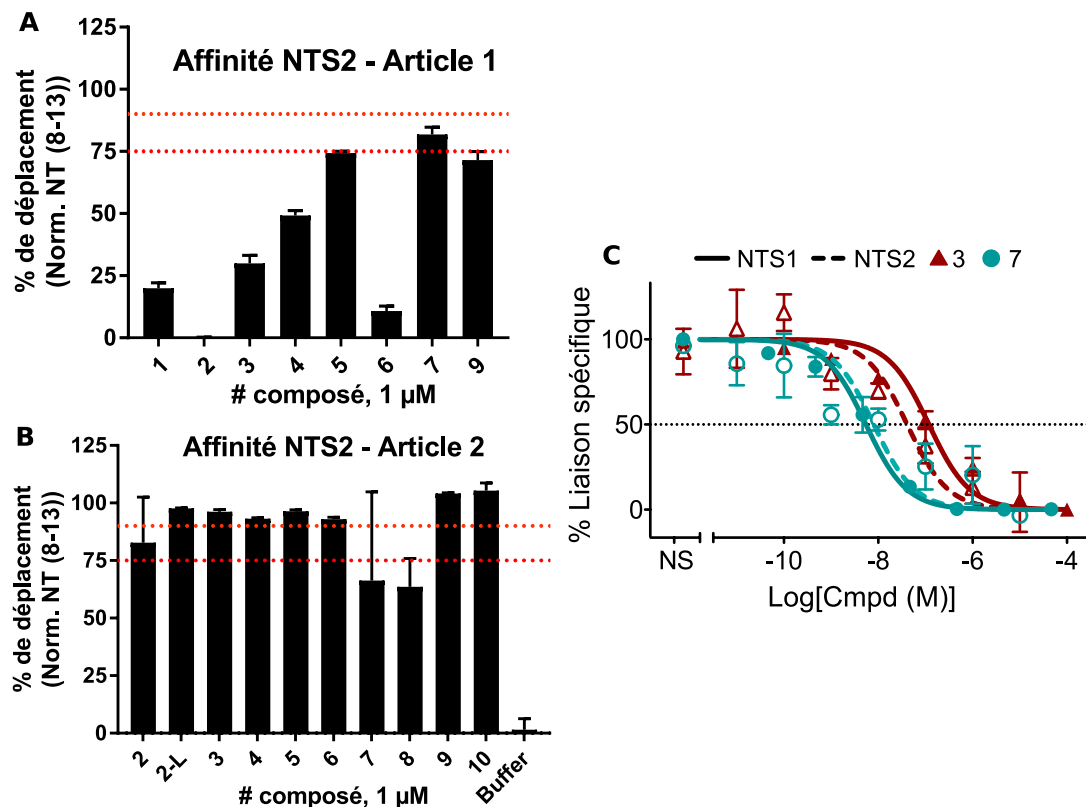


FIGURE 5.1 – **Affinité des composés pour NTS2.** Les histogrammes représentent le pourcentage de ^{125}I -[Tyr³]-NT déplacé par 1 μM de composé (moyenne de deux expériences \pm SD). (A) Composés du premier article; (B) Composés du deuxième article; (C) Courbes d'affinité des composés 3 et 7 du deuxième article pour NTS1 (lignes pleines) et NTS2 (lignes en pointillés).

5.2 Résultats

5.2.1 Affinité des macrocycles publiés sur NTS2

La capacité des composés des articles à déplacer la NT radiomarquée sur des membranes de cellules exprimant NTS2 a été utilisé comme critère d'évaluation de leur sélectivité. Afin de repérer rapidement les composés potentiellement sélectifs, ceux-ci ont d'abord été testés à une seule concentration (1 μM). L'essai est similaire à celui utilisé à la section 4.3.2.1, page 88, consiste à incuber des membranes de cellules exprimant NTS2 avec de la NT radiomarquée et le macrocycle, puis à filtrer et compter la radioactivité restante. Le pourcentage de déplacement de la NT radiomarquée à cette concentration a été utilisé comme valeur pour comparer les composés. Les résultats obtenus sont rapportés dans la figure 5.1.

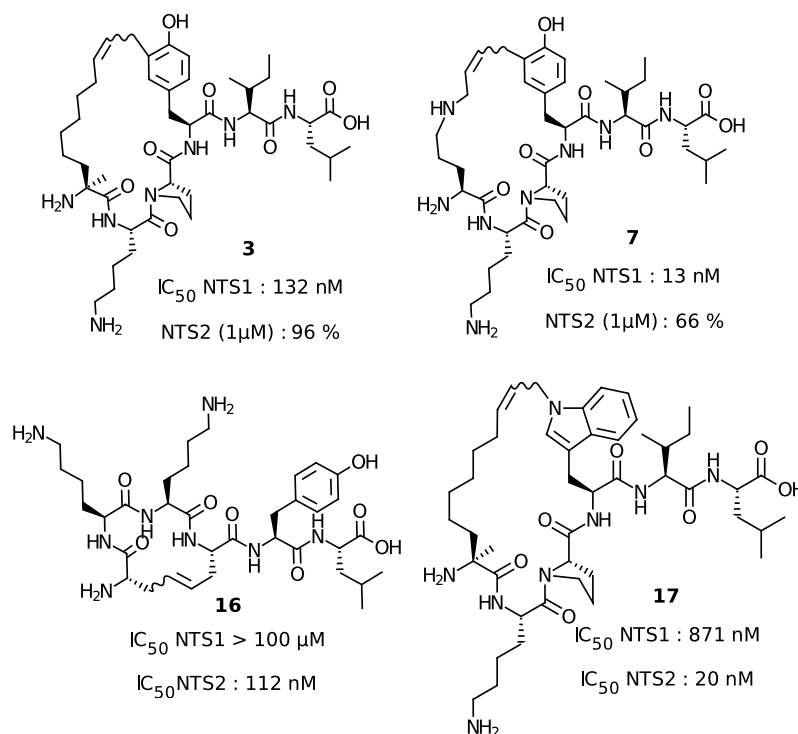


FIGURE 5.2 – Structure des composés non-sélectifs (**3** et **7** du 1^{er} article) et des composés sélectifs **16** et **17**

Première génération de macrocycles. Les composés du premier article (figure 3.1) qui ont pu être testés sur NTS2 (figure 5.1A) ont tous une IC_{50} pour NTS1 supérieure à 5 μ M (tableau 3.1). Les composés **1** à **4** et **6** déplacent moins de 50 % de la NT radiomarquée sur les membranes exprimant NTS2, ce qui semble indiquer que, comme NTS1, NTS2 ne tolère pas le repliement de NT (8-13). Le fait que **5** déplace 75 % de la NT ne va cependant pas nécessairement dans le sens de cette conclusion. La détermination de l' IC_{50} de **5** permettrait de clarifier cette observation.

Les composés **7** et **9**, qui ont été conçus pour être moins repliés que les macrocycles précédents, déplacent raisonnablement la NT radiomarquée sur les membranes exprimant NTS2 alors que leur IC_{50} sur NTS1 est très mauvaise (29.8 et 10.3 μ M, respectivement). Ceci suggère que ces macrocycles pourraient présenter une certaine sélectivité pour NTS2. Là encore, la détermination de l' IC_{50} est nécessaire afin de comparer avec rigueur les affinités pour chaque récepteur et conclure avec certitude sur la sélectivité.

Deuxième génération de macrocycles. Les composés du deuxième article (table S1, Annexe B, page 144) ont une bien meilleure affinité pour NTS1 que les composés de première génération (tableau 4.2, page 79). Leurs IC_{50} varient de 765 à 13 nM. Cette

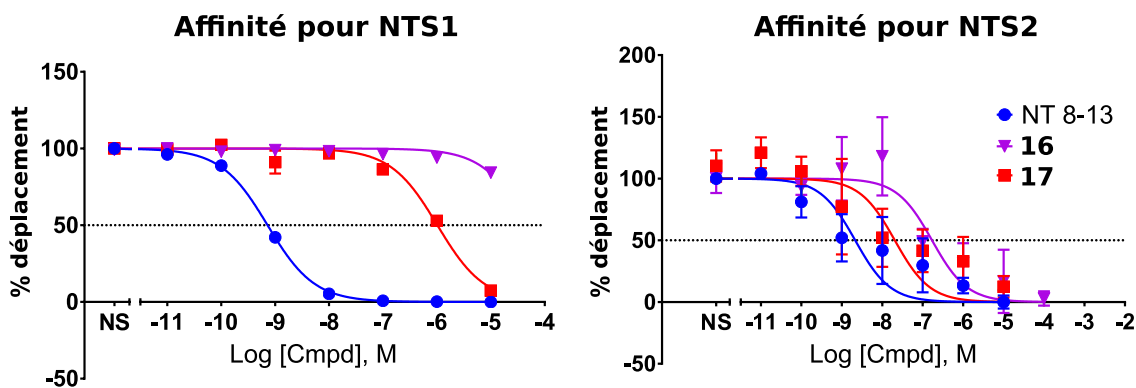


FIGURE 5.3 – Comparaison des affinités des composés 16 et 17 pour NTS1 et NTS2

forte affinité semble se retrouver sur NTS2 (figure 5.1B). En effet, à peu près tous les macrocycles déplacent la totalité de la NT radiomarquée. Les courbes complètes ont été déterminées pour les deux composés phares **3** et **7** (figure 5.1C). Pour ces deux macrocycles, les IC_{50} pour NTS1 et NTS2 sont très proches. L'effort pour augmenter l'affinité des macrocycles pour NTS1 semble donc avoir été positivement répercuté sur NTS2. Bien que seuls ces deux composés aient été caractérisés par une courbe d'affinité complète sur NTS2, on peut raisonnablement s'attendre à ce que les autres composés de cette série aient une affinité pour NTS2 du même ordre que celle qu'ils ont pour NTS1.

5.2.2 Composés non publiés

Identification d'un composé sélectif. Parmi les macrocycles de la première génération, plusieurs n'ont pas été publiés dans le premier article, la plupart ayant une très mauvaise affinité pour NTS1. Ceux-ci ont aussi été testés sur NTS2 à 1 μ M. L'un d'entre eux (composé **16**, figure 5.2) s'est révélé particulièrement intéressant. En effet, celui-ci possède une très faible affinité pour NTS1 ($> 10 \mu$ M) mais déplaçait la totalité de la NT radiomarquée sur les membranes exprimant NTS2. Son IC_{50} a donc été déterminée (courbe figure 5.3) et est de 112 nM. Ce composé a donc une excellente sélectivité et une forte affinité pour NTS2. Son IC_{50} pour NTS1 est, par contre, trop élevée pour être quantifiée, donc un ratio de sélectivité très supérieur à 20 000.

Stabilité. Afin d'apprécier la capacité de ce composé à résister à la dégradation, celui-ci a été incubé dans du plasma de rat à 37°C en utilisant la méthode décrite dans la section 4.3.2.3 page 89. Les résultats sont rapportés dans la figure 5.2A. La demi-vie du composé **16** (12 minutes), bien que plus longue que celle du peptide de référence NT (8-13), reste assez faible.

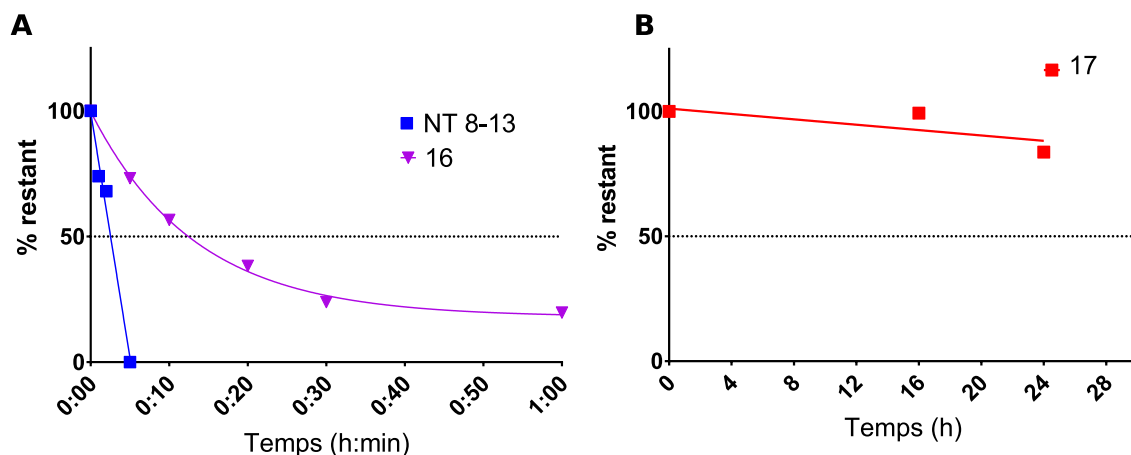


FIGURE 5.4 – Stabilité plasmatique des composés **16** et **17**

Structure. En C-terminal, le composé **16** n'a pas l'isoleucine 12 de la NT (8-13), ce qui pourrait en partie expliquer sa faible affinité sur NTS1. La macrocyclisation a lieu entre deux allylglycines en position 7 et 10 (selon la nomenclature de la NT). Les arginines 8 et 9 sont remplacées par des lysines et la proline par une allylglycine impliquée dans la macrocyclisation. Le macrocycle obtenu a donc une taille de 14 atomes et comprend les deux lysines.

Discussion. La ré-évaluation des macrocycles qui avaient une faible affinité pour NTS1 a permis de découvrir un composé ayant une très forte sélectivité pour NTS2. Sa structure étant remarquablement différente des autres macrocycles présentés dans ce document, la synthèse d'analogues permettant de dégager une relation structure/activité ou même structure/sélectivité est nécessaire. Notamment, un analogue de **16** retrouvant les deux résidus aliphatiques Ile-Leu en C-terminal permettrait de connaître l'influence de cette délétion sur la sélectivité. La faible stabilité gagnerait aussi à être étudiée et améliorée.

5.2.3 Conception de nouveaux composés

Tel que précisé plus haut, certains analogues linéaires de la NT (8-13) ayant un tryptophane en position 11 (à la place de la tyrosine) ont démontré une sélectivité envers NTS2. Nous avons donc voulu vérifier si cet effet pouvait se retrouver sur un macrocycle, en particulier avec notre modèle. Pour cela, la tyrosine a été remplacée par un tryptophane sur le macrocycle **3** du deuxième article (figure 5.2). Il se trouve qu'un tryptophane avec un groupement allyle sur l'azote de l'indole comporte le même nombre d'atomes entre l'allyl et l'amine α que la tyrosine-*o*-allyle (voir figure 5.5). Ainsi, remplacer l'un par l'autre produira un macrocycle de même taille (en nombre d'atomes). On peut donc supposer que

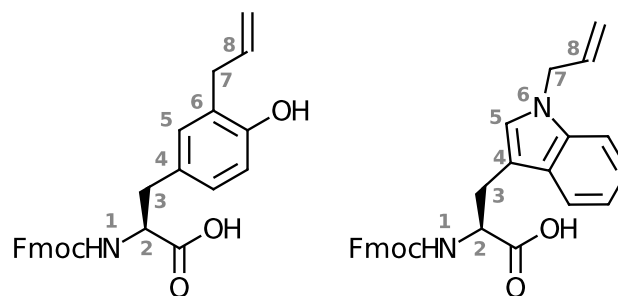


FIGURE 5.5 – Comparaison des structures de la tyrosine-*o*-allyl et du tryptophane-*N*-allyl

l'impact sur la conformation sera minimal, et que l'effet sur l'affinité sera principalement dû à la différence d'encombrement stérique.

Synthèse. La synthèse du Fmoc-Trp-*N*-allyl-OH (**15**), adaptée de Klarskov *et al.* (2018), est présentée dans la figure 5.6. Celle-ci commence par la protection de l'amine α par un Boc sur l'ester méthylique, suivie de l'alkylation de l'indole. Les groupes protecteurs de l'acide carboxylique et de l'amine α sont ensuite séquentiellement retirés, puis un Fmoc est introduit afin de pouvoir utiliser le chaînon directement en SPPS. Celui-ci a été utilisé pour synthétiser le composé **17** (figure 5.2), cyclisé entre ce chaînon et un résidu octenylalanine en *N*-terminal, ce qui en fait un analogue du composé **3** du deuxième article (celui-ci a une IC_{50} pour NTS1 de 132 nM et une demi-vie de 24 heures, tel qu'indiqué dans le tableau 4.2, section 4.2, page 79, et son effet analgésique a été démontré *in vivo*).

Sélectivité. Le composé **17** (figure 5.2) a une affinité de 871 nM pour NTS1 et de 20 nM pour NTS2 (voir les courbes sur la figure 5.3), soit un ratio de sélectivité de 44 : 1 en faveur de NTS2. Le composé **3** n'a pas été testé en courbe complète pour NTS2, donc il n'est pas encore possible de savoir si le changement de chaînon a eu un effet positif sur l'affinité pour ce récepteur, par contre on observe clairement un effet négatif sur l'affinité pour NTS1 (on passe de 132 nM avec la tyrosine (composé **3**) à 871 nM avec le tryptophane (composé **17**)).

Stabilité. Étant donné que la tyrosine est l'un des sites de dégradation de la neurotensine, il n'est pas surprenant de voir que le remplacement par un tryptophane augmente encore la demi-vie dans le plasma. En effet, après 24 heures d'incubation, la moitié du composé **3** a été consommée (voir figure 4.5B), tandis qu'il reste environ 80 % du composé **17**. Ceci fait du composé **17** le macrocycle le plus stable *in vitro*. Les sites de clivage de NT sont

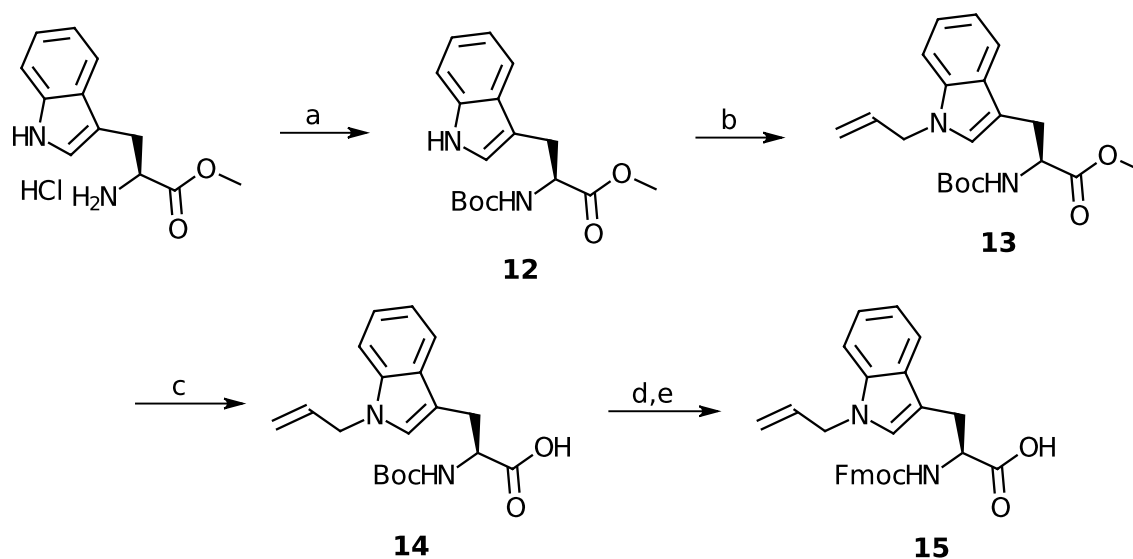


FIGURE 5.6 – **Synthèse du tryptophane *N*-acétylé.** (a) Boc_2O , Et_3N , THF, 4.5h, rt. (rdt 95 %) (b) Bromure d'allyle, Cs_2CO_3 , Acétone, 60°C , 68h. (rdt 60 %) (c) LiOH, THF/ H_2O , 1.5h, rt. (rdt 75 %) (d) DCM/TFA/ TiS , 4h, rt. (e) Fmoc-Cl, NaHCO_3 , THF/ H_2O , 4h, rt. (rdt 30 %)

connus : entre Arg⁸ et Arg⁹, et de part et d'autre de la Tyr¹¹ (voir section 1.2.1.2 page 10). Dans le deuxième article, on avait noté que si le résidu *N*-terminal se différencie fortement d'une lysine, on gagne drastiquement en stabilité (bien plus que changer la taille du cycle, par exemple). Ici, on constate que substituer la Tyr¹¹ augmente aussi significativement la stabilité. Il semble donc qu'en plus de la macrocyclisation, substituer les résidus clés à la reconnaissance par les protéases soit une stratégie efficace pour diminuer la dégradation.

5.3 Conclusion

Parmi les macrocycles déjà publiés, aucune sélectivité ne semble émerger au regard des données obtenues (figure 5.1). Bien que les courbes d'affinité entière n'aient pas encore été déterminées sur NTS2, les données de déplacement de la NT radiomarquée à $1\ \mu\text{M}$ suggèrent que les IC_{50} seront du même ordre que celles obtenues sur NTS1 pour la plupart des composés. Cependant, deux autres composés présentant, eux, une sélectivité remarquable ont été identifiés.

Le premier, **16**, avait été conçu pour se lier sur NTS1, mais s'est révélé très fortement sélectif envers NTS2. Malheureusement, celui-ci avait été abandonné jusqu'ici en raison de sa faible affinité pour NTS1. Il en résulte qu'aucune étude de relation structure-activité n'a été menée autour de ce type de macrocycles. Au-delà des essais *in vivo* qu'il faut

effectuer sur ce composé (en particulier d'analgésie, d'hypothermie et hypotension), il serait donc bon de concevoir des analogues de ce dernier afin de mieux appréhender les propriétés structurales induisant cette sélectivité.

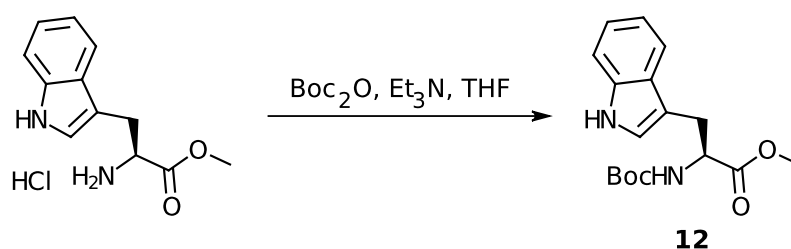
Le second, **17**, a lui été conçu spécifiquement pour augmenter la sélectivité des macrocycles existants, à partir d'indices existant dans la littérature. Ceci s'est révélé concluant, puisque le macrocycle **17** s'est avéré avoir une affinité 40 fois plus forte pour NTS2 que pour NTS1. En plus de cela, il hérite de l'augmentation de stabilité *in vitro* qui avait déjà été obtenue pour les macrocycles de la même famille. Les essais *in vivo* permettront de déterminer à quel point une telle sélectivité se reflète sur les effets physiologiques non désirables de la NT tels que l'hypotension et l'hypothermie.

Enfin, étant donnée que cette approche (le remplacement de la tyrosine par un autre acide aminé) s'est révélée fructueuse, il paraît judicieux de renouveler l'expérience avec une lysine. En effet, le remplacement de la Tyr¹¹ par une Lys permet d'induire de la sélectivité sur des analogues linéaires de la NT (8-13) (Fanelli *et al.*, 2015).

5.4 Matériel et Méthodes

5.4.1 Synthèse du Tryptophane N-allyle

5.4.1.1 Étape 1 : Protection de l'amine α



1 g d'ester méthylique de L-Trp 3.93 mmol, 1 eq) a été placé dans un ballon sec, sous argon, puis dissout dans 6.67 mL de THF. 547 μL de triéthylamine (3.93 mmol, 1 eq) ont été ajoutés, suivis de 3.33 mL d'une solution de THF contenant 902 μL de di-*tert*-butyl dicarbonate (3.93 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 4.5 heures (la progression de la réaction a été suivie par CCM). Le solvant a été évaporé sous vide puis le brut réactionnel a été partitionné entre AcOEt et eau. La phase organique a été lavée à l'eau, séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide pour obtenir 1.15 g d'une poudre blanche (rendement : 95%).

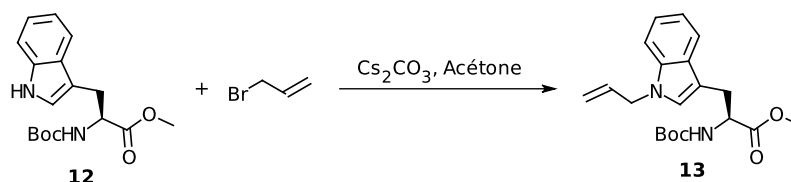
¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 7.5 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.3 (dt, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.2

(ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.1 (ddd, $J = 7.9, 7.1, 1$ Hz, 1H) 6.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.05 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.63 (td, $J = 5.32, 8.28$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.27 (dd, $J = 2.6, 5.3$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) : δ 172.9, 155.4, 136.1, 127.7, 122.9, 122.3, 119.7, 118.8, 111.3, 110.2, 80.0, 54.3, 52.4, 28.2

UPLC-MS : $t_R = 1.54$ min ; $\frac{m}{z} = 319.76$ (masse monoisotopique = 318.16).

5.4.1.2 Étape 2 : Allylation



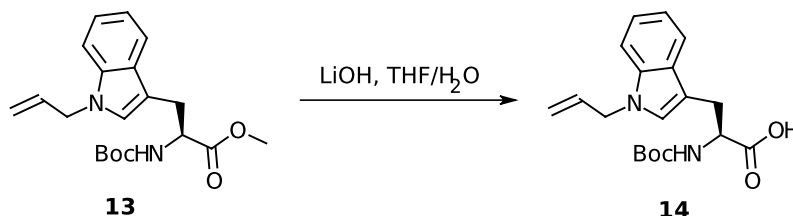
625 mg d'ester méthylique de Boc-L-Trp **12** (1.96 mmol, 1 eq) ont été dissouts dans 12.5 mL d'acétone. 510 μL de bromure d'allyle (5.89 mmol, 3 eq) et 644 mg de carbonate de césium (1.96 mmol, 1 eq) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité à 60 °C pendant 4 jours. Après retour à la température ambiante, le mélange a été filtré puis évaporé sous vide. Le brut obtenu a été dissous dans AcOEt puis lavé avec de l'eau et de la saumure. La phase organique a été séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le brut obtenu a été purifié par chromatographie flash pour donner 425 mg d'une huile légèrement jaune (rendement : 60%).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 7.5 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.3 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.2 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.1 (ddd, $J = 8.0, 6.8, 1.1$ Hz, 1H), 6.8 (s, 1H), 5.9 (ddt, $J = 17.1, 10.6, 5.3$ Hz, 1H), 5.2 (dd, $J = 10.3, 1.3$ Hz, 1H), 5.0 (d, $J = 16.7$ Hz, 2H), 4.7 (dt, $J = 5.2, 1.6$ Hz, 2H), 4.1 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.6 (s, 3H), 3.3 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 2.0 (s, 3H), 1.6 (s, 1H), 1.4 (s, 9H), 1.2 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) : δ 172.4, 154.9, 136.0, 133.2, 128.0, 126.2, 121.5, 118.9, 116.8, 109.3, 79.4, 54.0, 51.9, 46.3, 27.8

UPLC-MS : $t_R = 1.86$ min ; $\frac{m}{z} = 359.9$ (masse monoisotopique = 358.19).

5.4.1.3 Étape 3 : Déprotection de l'acide carboxylique



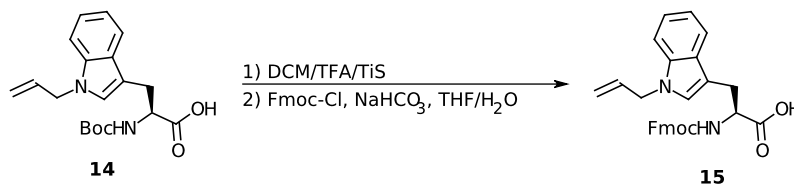
900 mg d'ester méthylique de Boc-L-Trp(Allyl) **13** (2.51 mmol, 1 eq) ont été dissouts dans 15 mL de THF. 7.4 mL de solution aqueuse contenant 361 mg d'hydroxyde de lithium (15.1 mmol, 6 eq) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 3 heures (la progression de la réaction a été suivie par CCM). La solution a été diluée avec de l'acétate d'éthyle puis lavée avec une solution de HCl 1 N, de l'eau puis de la saumure. La phase organique a été séchée sur MgSO₄ et concentrée sous vide. 750 mg de produit ont été obtenus sous forme d'huile incolore (rendement : 75%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : δ 7.6 (dt, J = 8.0, 0.9 Hz, 1H), 7.3 (dt, J = 8.2, 0.8 Hz, 1H), 7.2 (ddd, J = 8.3, 7.0, 1.3 Hz, 1H), 7.1 (ddd, J = 7.9, 7, 1 Hz, 1H), 6.9 (s, 1H), 5.9 (ddt, J = 17.1, 10.2, 5.2 Hz, 1H), 5.2 (ddd, J = 10.2, 1.2, 2.6 Hz, 1H), 5.0 (ddd, J = 17.1, 1.7, 3.3, Hz, 1H), 4.7 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.3 (td, J = 14.7, 5.6 Hz, 2H), 1.4 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) : δ 176.9, 155.6, 136.4, 133.5, 126.5, 126.8, 121.9, 119.4, 117.3, 109.7, 109.0, 80.2, 60.6, 54.3, 48.7, 28.4, 21.1, 14.3

UPLC-MS : t_R = 1.69 min ; $\frac{m}{z}$ = 345.9 (masse monoisotopique = 344.17).

5.4.1.4 Étape 4 : Déprotection/protection de l'amine α



650 mg de Boc-L-Trp(Allyl)-OH **14** (1.89 mmol) ont été dissouts dans 10 mL de solution TFA/DCM (1 : 1) + 1% TiS. La réaction a été suivie par CCM et concentrée sous vide après complétion. Le brut obtenu a été dissous dans 7 mL d'eau puis le pH de cette solution a été ajusté à 7-8 par ajout de bicarbonate de sodium. 5 mL de solution de THF contenant 586 mg de chlorure de Fmoc (2.26 mmol, 1.2 eq) ont été ajouté puis le tout a été agité à température ambiante pendant 4 heures. Le THF a ensuite été évaporé sous vide puis la phase aqueuse a été lavée à l'éther diéthylique. Le pH de la phase aqueuse a ensuite été ajusté à 1-2 par ajout de HCl 1 N et le produit a été extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique a été lavée avec de la saumure puis séchée sur MgSO₄ et concentrée sous vide. Le produit a été purifié par chromatographie flash pour obtenir 255 mg d'une huile (rendement sur deux étapes : 30 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : δ 7.7 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.6 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.5 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.4 (m, 2H), 7.3 (m, 2H), 7.2 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.1 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.9 (s, 1H), 5.9 (m, 1H), 5.3 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.1 (dq, J = 10.2, 1.3 Hz, 1H), 5.0 (dq, J = 17.1, 1.3 Hz, 1H), 4.7 (dd, J = 14.0, 5.5 Hz, 1H), 4.6 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.4 (dd, J =

28.7, 7.2 Hz, 1H), 4.4 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.2 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.3 (br, 1H), 1.4 (s, 1H), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) : δ 176.8, 156.1, 143.9, 141.4, 136.5, 133.5, 127.8, 127.2, 126.9, 125.3, 122.0, 120.1, 119.6, 118.9, 117.3, 109.9, 108.7, 67.3, 54.7, 48.7, 47.3, 27.8, 20.9, 17.8, 12.4

UPLC-MS : t_R = 1.83 min ; $\frac{m}{z}$ = 468.0 (masse monoisotopique = 466.19).

5.4.2 Synthèse peptidique et essais biologiques

Les méthodes utilisées sont celles décrites dans les sections expérimentales des articles. Se référer aux sections 4.3.1 à 4.3.1.4, page 83 pour la synthèse peptidique, 4.3.1.9 page 86 pour la cyclisation, 4.3.1.11 et 4.3.1.12 page 87 pour le clivage et la purification.

Les essais d'affinité ont été effectués tel que décrit dans la section 4.3.2.1, page 88 ; pour les essais de stabilité plasmatique voir section 4.3.2.3 page 89.

6 DISCUSSION GÉNÉRALE

6.1 Discussion

Les résultats présentés dans ce document confirment notre hypothèse de départ, qui était que la macrocyclisation allait permettre l'amélioration des propriétés pharmacologiques de la NT (8-13).

Le premier objectif (l'identification d'une conformation favorable à la liaison, chapitre 3) a été réalisé par la conception rationnelle de macrocycles présentant une grande diversité structurale. L'évaluation de leur affinité pour NTS1, couplée à la modélisation, a permis de mieux comprendre l'interaction entre le récepteur et son ligand. Ceci a mené à l'identification d'un peptide qui, une fois macrocyclisé, a une bien meilleure affinité pour NTS1 que son analogue linéaire. Ce macrocycle a donc servi de base pour la suite du projet.

Le deuxième objectif (chapitre 4) est en fait constitué de deux sous-objectifs : 1) la relation-structure activité de ce modèle de macrocycle et 2) la caractérisation *in vivo* des meilleurs macrocycles obtenus. Le premier sous-objectif a permis d'identifier les éléments structurels responsables d'une meilleure affinité et d'une meilleure stabilité, et de constater que ces éléments agissent plutôt en opposition sur ces paramètres.

Concernant l'activité de ces macrocycles, les tests effectués sur quatre voies de signalisation différentes ont permis de faire ressortir le caractère non biaisé de ces composés. Tous activent en effet toutes les voies de manière semblable à la NT, ce qui n'est pas surprenant étant donné que pour atteindre une affinité acceptable, beaucoup d'efforts ont été faits pour que ces macrocycles ressemblent le plus possible à la NT (8-13). Obtenir un biais signalétique aurait nécessité une plus grande divergence structurale et aurait été extrêmement intéressant à étudier *in vivo* puisqu'il n'existe pas à ce jour d'information permettant d'associer une voie de signalisation à un effet physiologique pour le système neurotensinergique. De plus, il a été montré que des agonistes du récepteur aux opioïdes μ peuvent avoir un effet analgésique sans produire d'effet de tolérance et dépendance en activant seulement les protéines G et pas les β -arrestines (Manglik *et al.*, 2016).

La caractérisation *in vivo* des deux meilleurs macrocycles a permis de démontrer leur puissant effet analgésique dans deux modèles de douleur différents : un modèle de douleur aiguë (le test de retrait de la queue) et un modèle de douleur inflammatoire (le test d'in-

jection de formaline). Afin d'évaluer la pertinence de ces composés dans l'optique d'un traitement de la douleur chronique, il sera important de les tester dans d'autres modèles de douleur tels que la douleur arthritique (van den Berg *et al.*, 2007) ou neuropathique (Decosterd et Woolf, 2000). Le cas de la douleur neuropathique est particulièrement pertinent puisque c'est un domaine où les opioïdes sont relativement peu efficaces (Kennedy, 2007).

Enfin, le troisième objectif a découlé du fait que les macrocycles obtenus ont les mêmes effets secondaires que la NT, c'est-à-dire qu'ils provoquent une hypotension et une hypothermie. Or, ces effets sont associés à NTS1. Cibler sélectivement NTS2 pourrait donc permettre de s'affranchir de ces effets. Heureusement, le récepteur NTS2 semble beaucoup plus tolérant aux changements structuraux sur NT (8-13) que ne l'est NTS1, en particulier au niveau de la tyrosine 11. Plusieurs types de macrocycles présentant une sélectivité intéressante ont donc pu être rapidement identifiés et peuvent servir de point de départ pour des études plus avancées.

6.2 Conclusion

Au regard de l'actuelle épidémie d'addiction aux opioïdes, le développement de composés analgésiques alternatifs est d'une importance capitale. D'autant plus que cette addiction concerne aussi les dérivés de la morphine utilisés sur le marché du médicament. Dans cette optique, les RCPG NTS1 et NTS2 s'avèrent être des cibles particulièrement appropriées. En effet, il a été démontré que leur effet analgésique peut être au moins aussi puissant que celui de la morphine (chez les rongeurs), tout en étant moins propice au développement d'un comportement de dépendance (Mustain *et al.*, 2011). D'autres effets des opioïdes, tels que la dépression respiratoire et cardiaque, ne seraient pas provoqués par l'activation des récepteurs à la NT.

Nous avons saisi cet état des lieux comme une opportunité d'explorer la relation structure-activité entre la neurotensine et ses récepteurs *via* des analogues macrocycliques. Garder la structure peptidique de base donne plus de chance de garder la spécificité du ligand endogène, tandis que la macrocyclisation permet de maîtriser la conformation du ligand, ainsi que d'agir sur des propriétés telles que la résistance aux protéases.

Cependant, identifier une façon de macrocycliser qui serait favorable à la liaison avec le récepteur s'est avéré être le plus gros défi de ce projet. Sans la publication du crystal, il est possible que des macrocycles ayant une bonne affinité pour NTS1 n'aient jamais vu le jour, étant donnée que la conformation hypothétique que nous essayions d'obtenir était complètement différente de celle adoptée par le ligand endogène dans la poche de liaison. Ce récepteur s'avère d'ailleurs très peu tolérant envers des changements de structure sur

son ligand.

Au final, la modélisation a permis de concevoir des macrocycles ayant une forte affinité et capables d'activer ce récepteur. Cette activation provoque bien l'effet analgésique attendu, et les composés sont largement plus stables (*in vitro*) que le peptide de référence NT (8-13).

L'histoire de leur développement est néanmoins loin d'être terminée. Leur effet analgésique n'a pour le moment été constaté que par injection dans le système nerveux. Il n'y a donc pas d'information sur leur capacité à traverser la BHE. Leur taille et leur polarité rendant moins probable une diffusion passive, il faut s'attendre à devoir les coupler à un ligand de transporteur ou à en faire des pro-drogues.

D'un autre côté, et comme mentionné dans le chapitre 5, le récepteur NTS2 pourrait s'avérer être une cible bien plus attractive que NTS1 pour développer des médicaments. Non seulement il a été montré que son activation ne provoque pas les effets tels que hypotension et hypothermie, il n'est exprimé qu'au niveau du SNC. NTS1 est, lui, exprimé notamment au niveau gastro-intestinal. De potentiels composés biodisponible oralement non-sélectifs ou sélectifs envers NTS1 pourraient donc présenter des effets indésirables additionnels, que n'auraient pas des composés sélectifs envers NTS2.

Heureusement, les options pour gagner en sélectivité ne manquent pas, comme nous l'avons montré au chapitre 5. Les deux macrocycles présentés confirment la tendance qui ressort des composés de la littérature, c'est-à-dire qu'il semble même plus facile de diminuer l'affinité pour NTS1 que celle pour NTS2.

Bien que cela ne soit pas forcément apparent ici, la phase de recherche de la conformation de macrocycle favorable à la liaison s'est apparentée à une tentative d'allumer un feu de camp sous la pluie. Énormément de persévérance a été nécessaire pour arriver au premier macrocycle. Une fois celui-ci obtenu, la phase d'optimisation a été extrêmement satisfaisante et a permis de montrer que de tels composés sont très prometteurs.

De nombreux défis passionnants restent à relever, et j'espère que celles et ceux qui reprendront mon flambeau auront beaucoup de plaisir à faire progresser cette recherche.

7 REMERCIEMENTS

Je crois qu'aucune réalisation humaine ne peut être le fait d'une seule personne, en particulier dans le domaine scientifique. Tout chercheur, étudiant, personne, fait partie d'un écosystème sans lequel on ne pourrait rien accomplir. Bien que je ne puisse donc pas nommer chaque personne ayant directement ou indirectement à ma modeste contribution scientifique présentée ici, j'aimerais remercier celles qui m'ont accompagné durant mes années d'études ici à Sherbrooke.

Je remercie tout d'abord mes directeurs de recherche Éric Marsault et Richard Leduc, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et donné cette opportunité unique de mener mes recherches ainsi que pour tout leur soutien et leurs conseils avisés et pour m'avoir poussé à devenir un meilleur scientifique. Je remercie également notre collaborateur Philippe Sarret, pour m'avoir toujours ouvert les portes de son laboratoires et ainsi permis de m'impliquer bien plus avant dans mon propre projet. Merci aussi à tous les membres des laboratoires des ces trois excellents chercheurs, où j'ai toujours trouvé des personnes dispensant leur aide avec plaisir et passion.

Je remercie aussi tous mes co-auteurs pour leurs relectures et critiques, sans qui je n'aurais pas pu mener mes macrocycles aussi loin. En particulier Rebecca et Mélanie, pour leurs contributions à la caractérisation. Merci aussi à Charles pour son enthousiasme envers le projet et pour avoir mené à bien les synthèses que je lui ai confié.

J'aimerais remercier les personnes qui m'ont enseigné ou apporté leur assistance de manière notable, comme Pierre-Luc qui m'a appris à utiliser le logiciel de modélisation MOE, un outil qui m'est vite devenu indispensable ; Marc-André pour son expertise fascinante pour la chimie qui m'a plusieurs fois sorti d'impasse ou de situations difficiles et avec qui j'ai découvert le jeu de Go ; et Annie, experte *ès* purification et toujours prompte à porter assistance à un étudiant en difficulté.

Merci aussi à Christine pour n'avoir jamais peur de donner son opinion et ses critiques, et sa volonté à pousser les autres vers l'excellence, et m'avoir toujours apporté son aide quand j'en avais le plus besoin. Merci à Alex, mon comparse et colocataire pendant la majeure partie de mes études ici, pour toutes les discussions enrichissantes, en science et en général et pour son soutien indéfectible dans les moments les plus difficiles. Et bien sûr merci à Élie, à qui revient certainement la médaille de l'enseignement puisqu'il m'a non

seulement transmis énormément de savoir théorique, appris à maîtriser l'essai d'affinité mais a aussi pris le risque de m'apprendre à conduire.

Puisque la vie d'un étudiant ne se résume pas au laboratoire (quoiqu'en pensent les directeurs), merci à ceux qui ont rendu la vie à Sherbrooke inoubliable. Merci Christian, Étienne, Kien, Félix, Marc-André, Alex et Laurent pour les innombrables soirées jeux de plateau. Merci à ceux qui ont généreusement ouvert les portes de leurs maisons : Mike et Mélanie, Léna, Céline, Hugo, Élie et Christine. Merci à Antoine, David et Félix avec qui j'ai découvert les parcs du Québec. Merci aux membres d'Équipe Capoeira Brasileira Sherbrooke, surtout Chansa pour m'avoir fait découvrir et communiqué la passion pour ce sport et cette culture, *muito obrigado*.

Merci à mes vieux amis Loïc, Thomas, Antoine et Yves, pour être restés proches malgré la distance.

Plus que tout, je remercie mes plus forts soutiens, les meilleures personnes que je connaisse, ma famille.

Et enfin je remercie les membres du jury d'avoir accepté la relecture de ce document et d'apporter leur expertise critique qui permettra de le rendre meilleur.

8 ANNEXES

8.1 Annexe A : Information supplémentaire du 1^{er} article (Chapitre 3)

In search of the optimal macrocyclization sites for neurotensin.

Marc Sousbie, Élie Besserer-Offroy, Rebecca Brouillette, Jean-Michel Longpré, Richard Leduc, Philippe Sarret and Éric Marsault*.

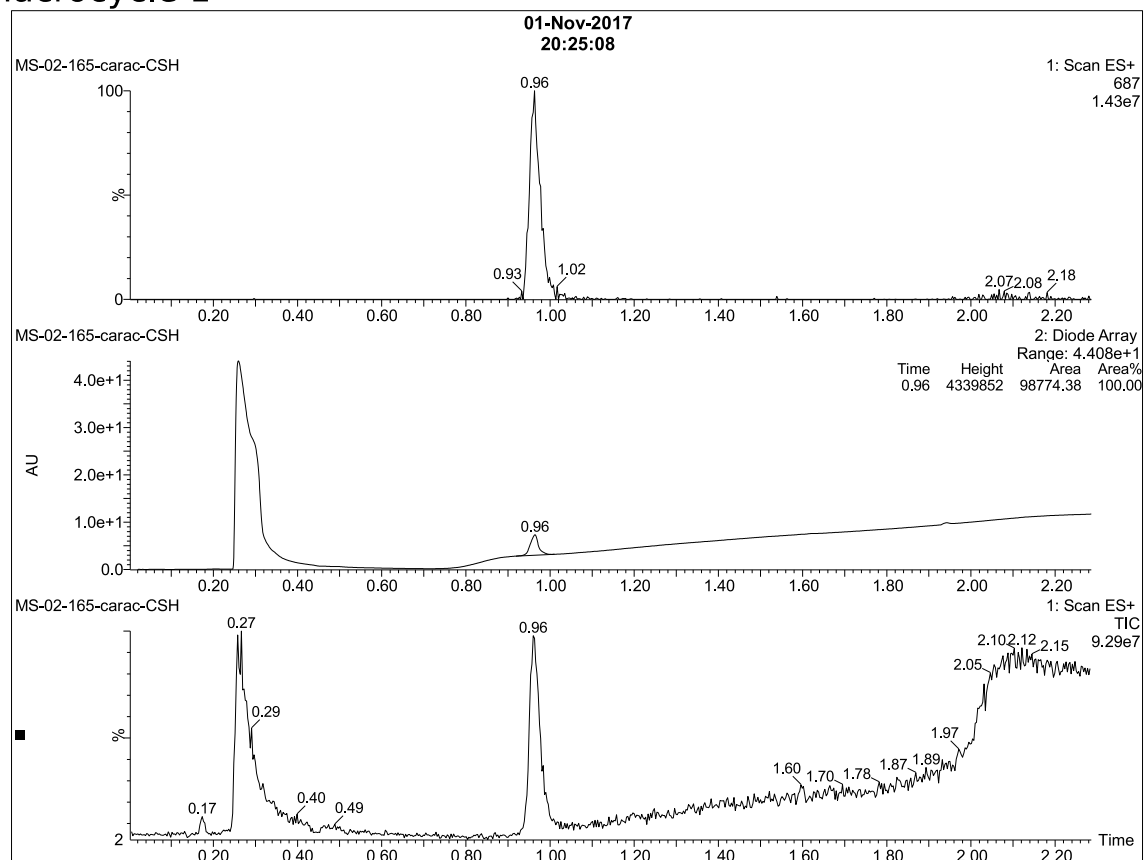
Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, 3001 12^e Avenue Nord, Sherbrooke Qc, J1H 5N4, Canada

Supplementary Information

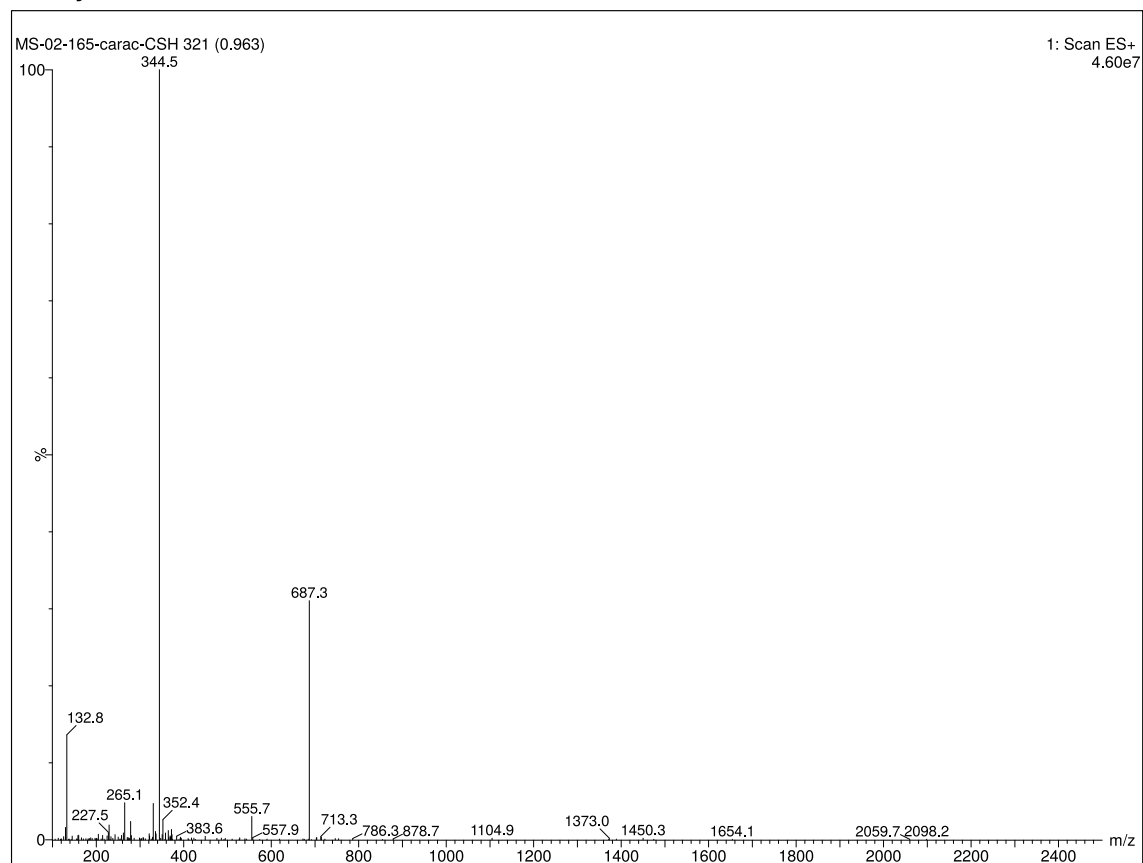
Compounds characterisation

Compound	Obtained (mg)	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	Purity (%)	Exact Mass (calculated)	Exact Mass (found)	Ion
1	7.7	C ₃₄ H ₅₁ N ₇ O ₈	685.8	100	686.3872	686.3853	[M+H] ⁺
1-L	24	C ₃₆ H ₅₅ N ₇ O ₈	713.9	99.5	714.4185	714.4182	[M+H] ⁺
2	6.5	C ₃₄ H ₅₁ N ₇ O ₈	685.8	100	686.3872	686.3880	[M+H] ⁺
3	7.1	C ₃₄ H ₅₁ N ₇ O ₈	685.8	100	686.3872	686.3869	[M+H] ⁺
4	5.8	C ₃₄ H ₅₁ N ₇ O ₈	685.8	100	686.3872	686.3883	[M+H] ⁺
5	14.8	C ₃₄ H ₅₁ N ₇ O ₈	685.8	96.9	686.3872	686.3873	[M+H] ⁺
6	20.6	C ₃₆ H ₅₅ N ₇ O ₁₀	745.9	100	746.4083	746.4089	[M+H] ⁺
7	8.4	C ₃₃ H ₅₀ N ₆ O ₈	658.8	90.7	659.3763	659.3757	[M+H] ⁺
8	8.4	C ₃₈ H ₅₉ N ₇ O ₈	741.9	100	742.4498	742.4475	[M+H] ⁺
9	2.8	C ₃₉ H ₆₁ N ₇ O ₉	771.9	100	772.4604	772.4622	[M+H] ⁺
10	3.3	C ₄₂ H ₆₆ N ₆ O ₈	783.0	100	783.5015	783.5023	[M+H] ⁺
10-L	4.4	C ₄₄ H ₇₀ N ₆ O ₈	811.1	100	811.5328	811.5329	[M+H] ⁺
Linker A	-	C ₂₁ H ₂₁ NO ₅	367.4	97	390.1312	390.1323	[M+Na] ⁺
Linker B	-	C ₂₇ H ₂₅ NO ₅	443.5	99	466.1625	466.1636	[M+Na] ⁺

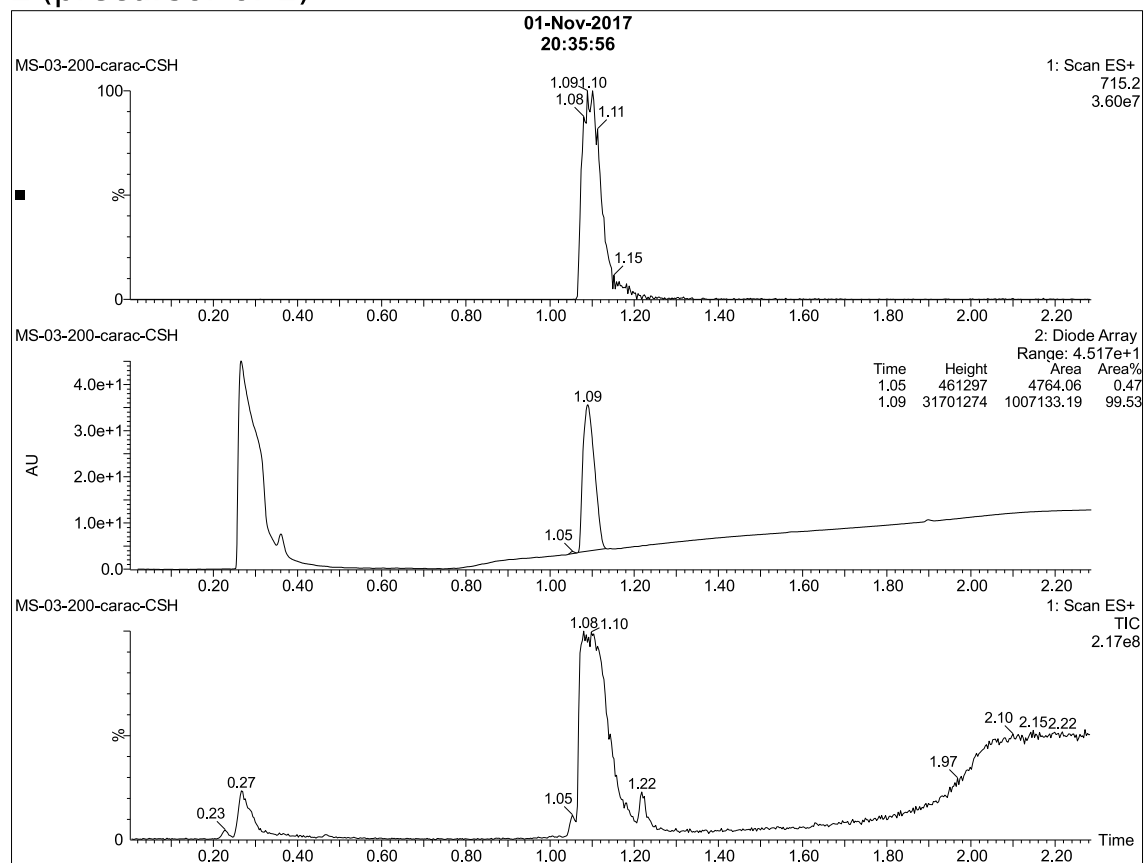
Macrocycle 1



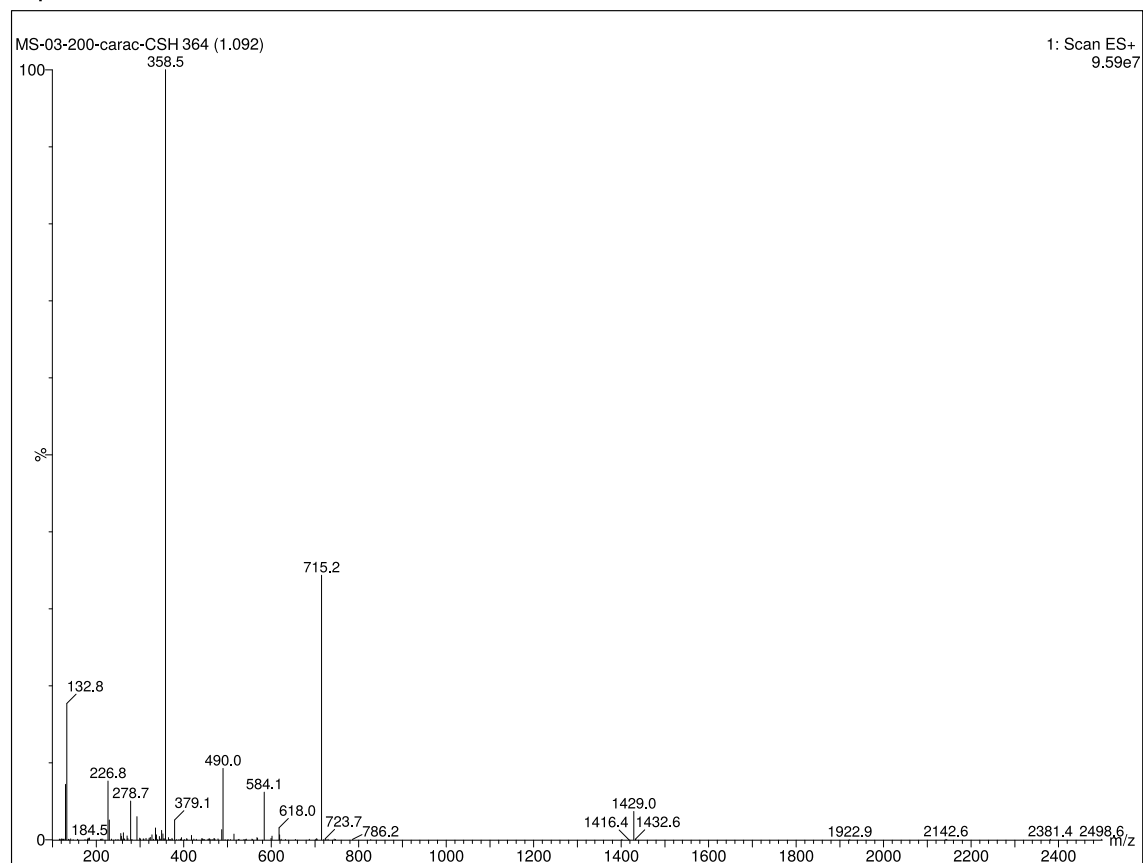
Macrocycle 1



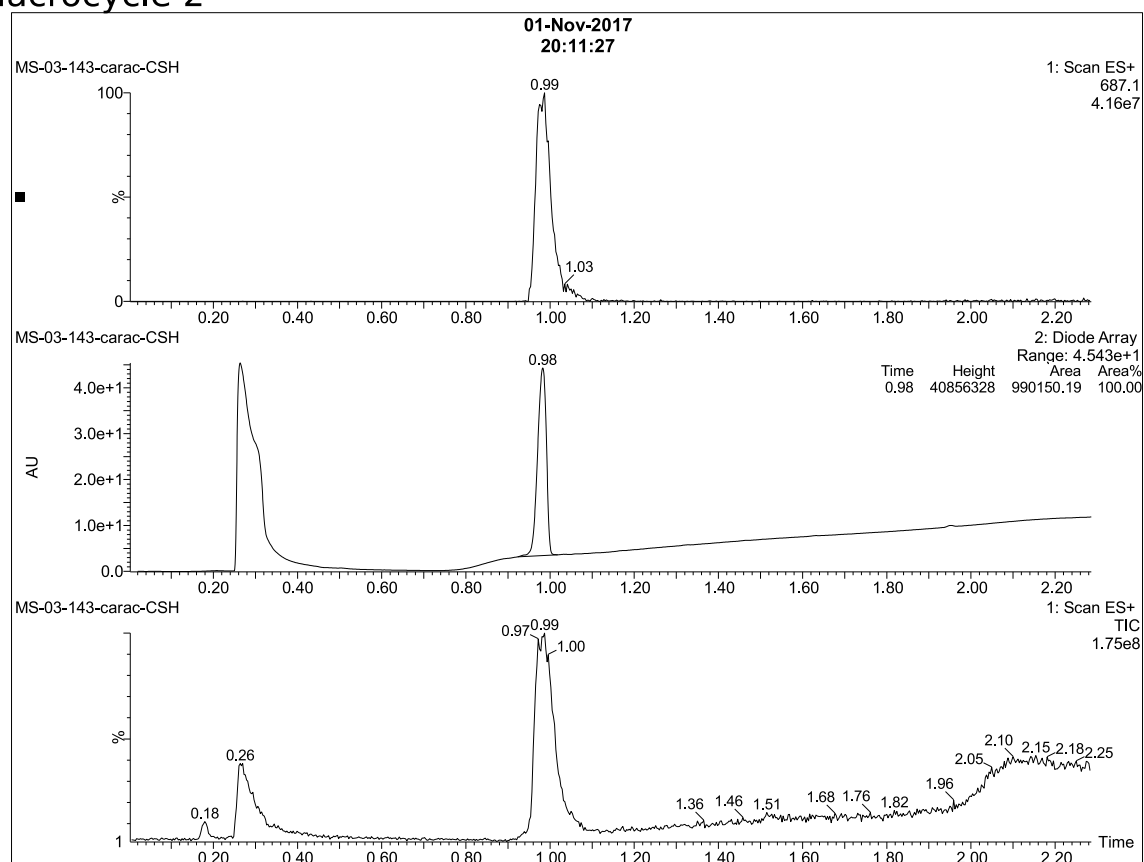
1-L (precursor of 1)



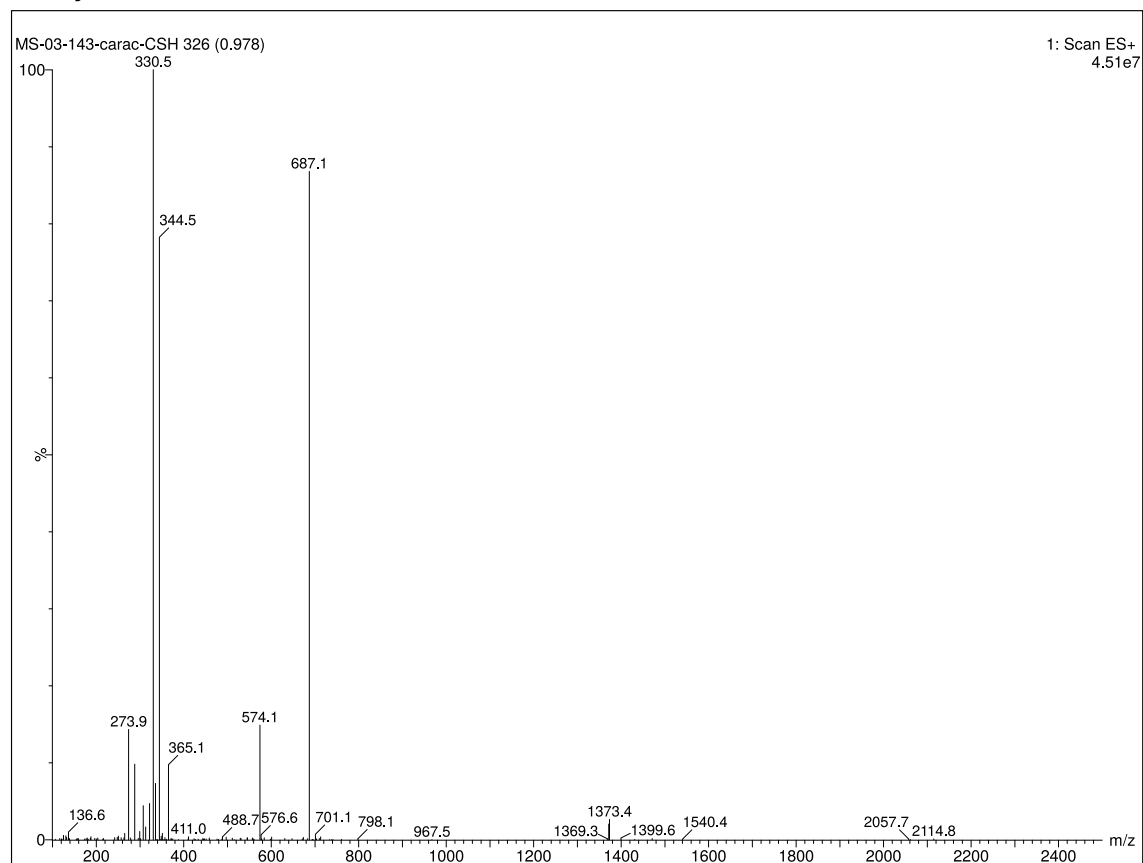
1-L (precursor of 1)



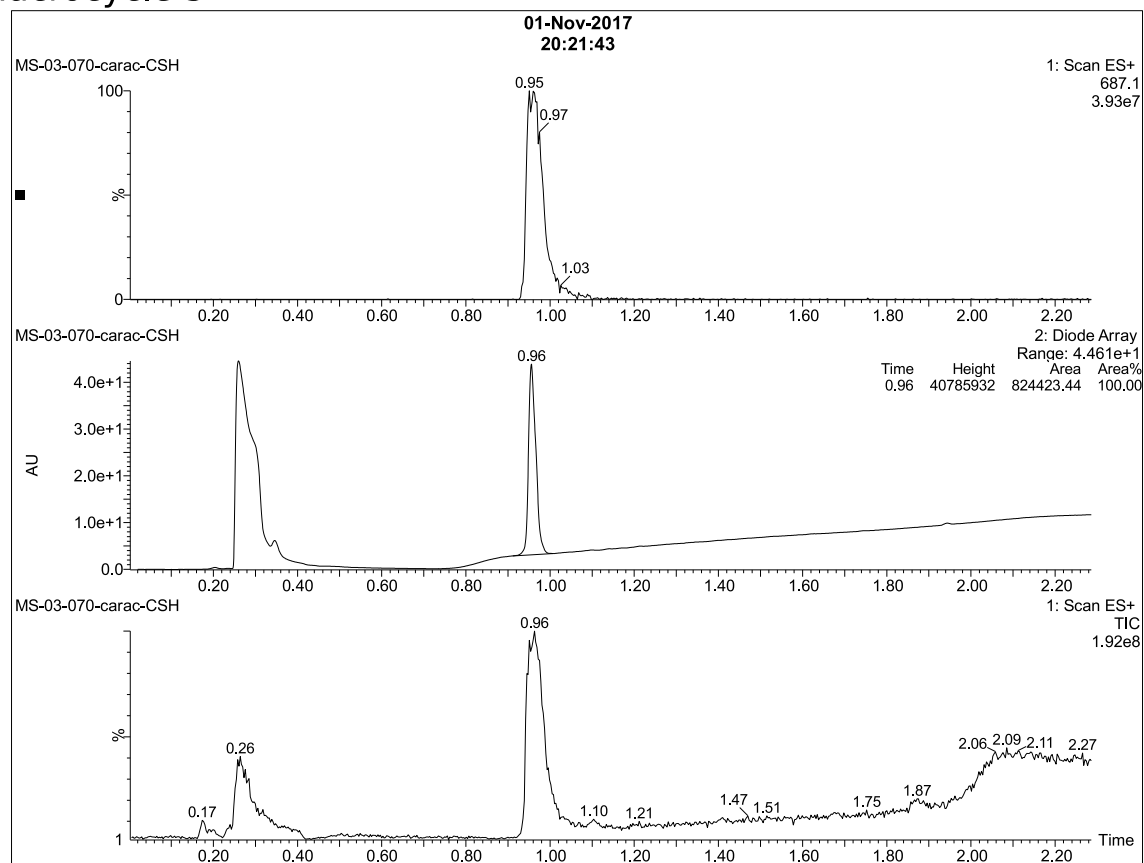
Macrocycle 2



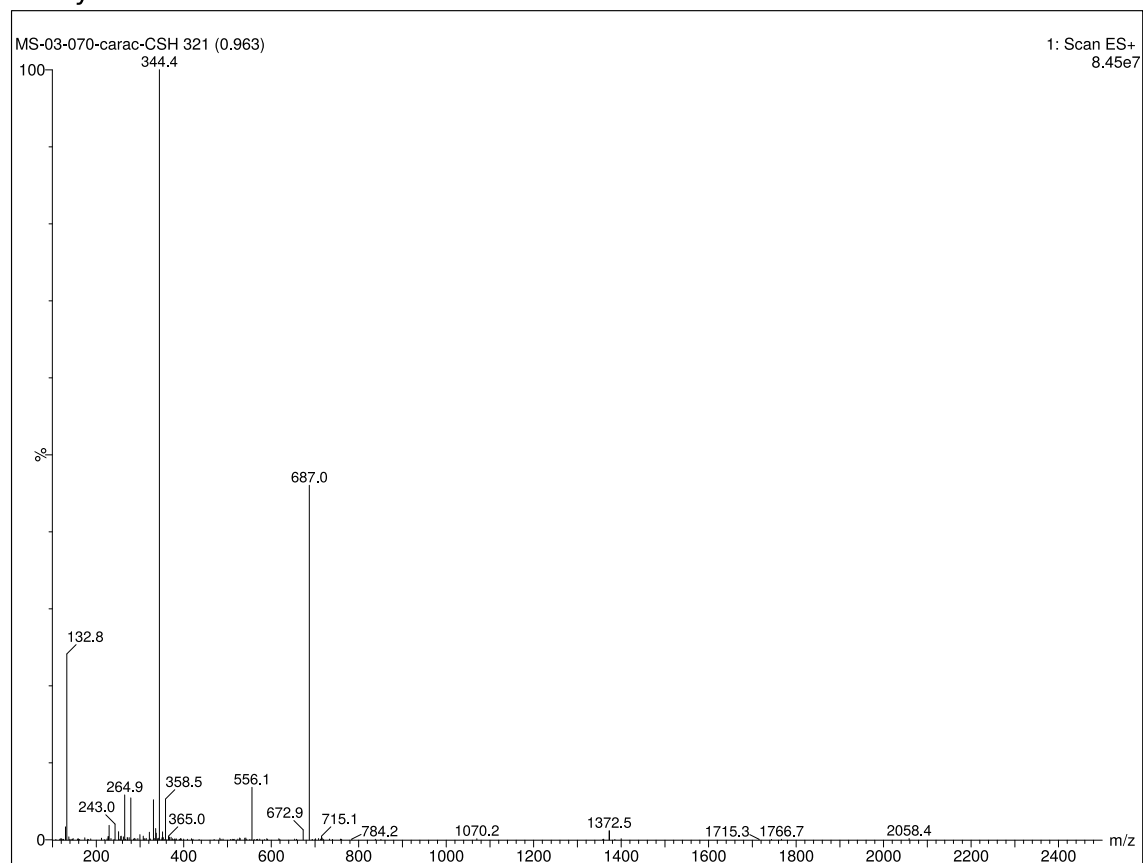
Macrocycle 2



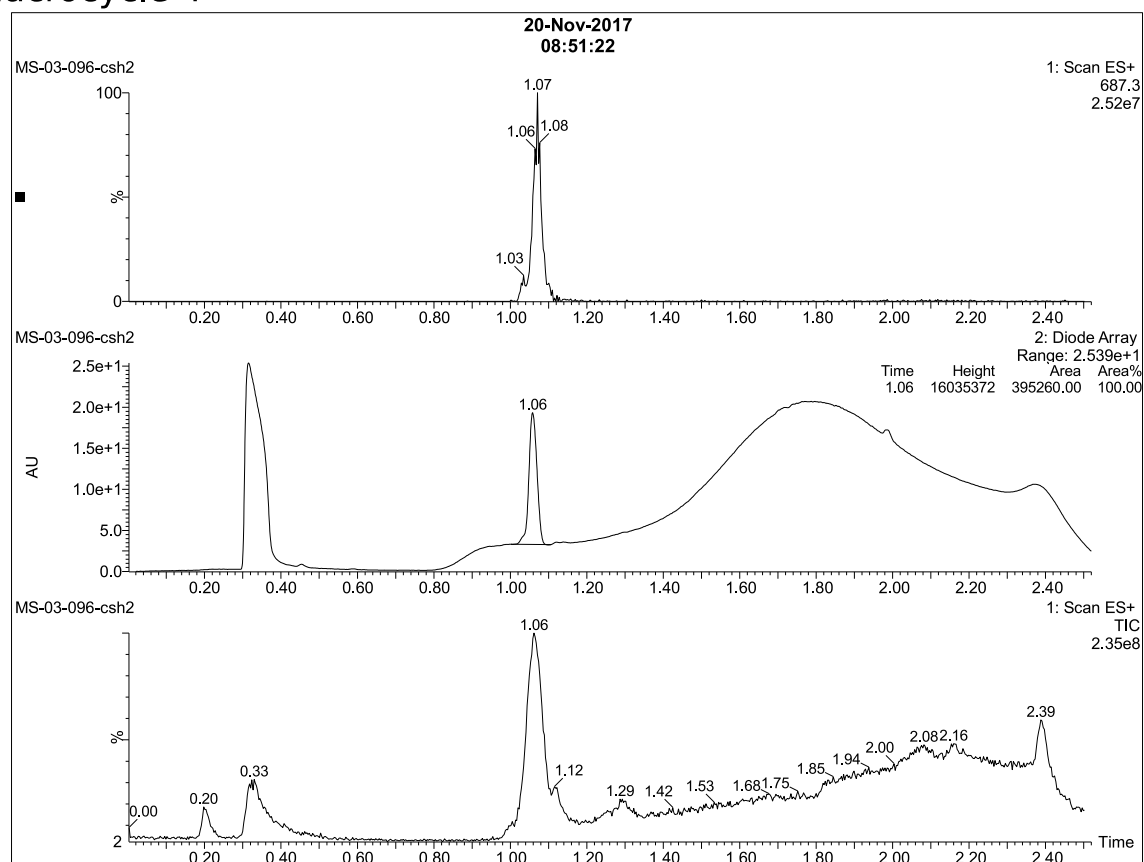
Macrocycle 3



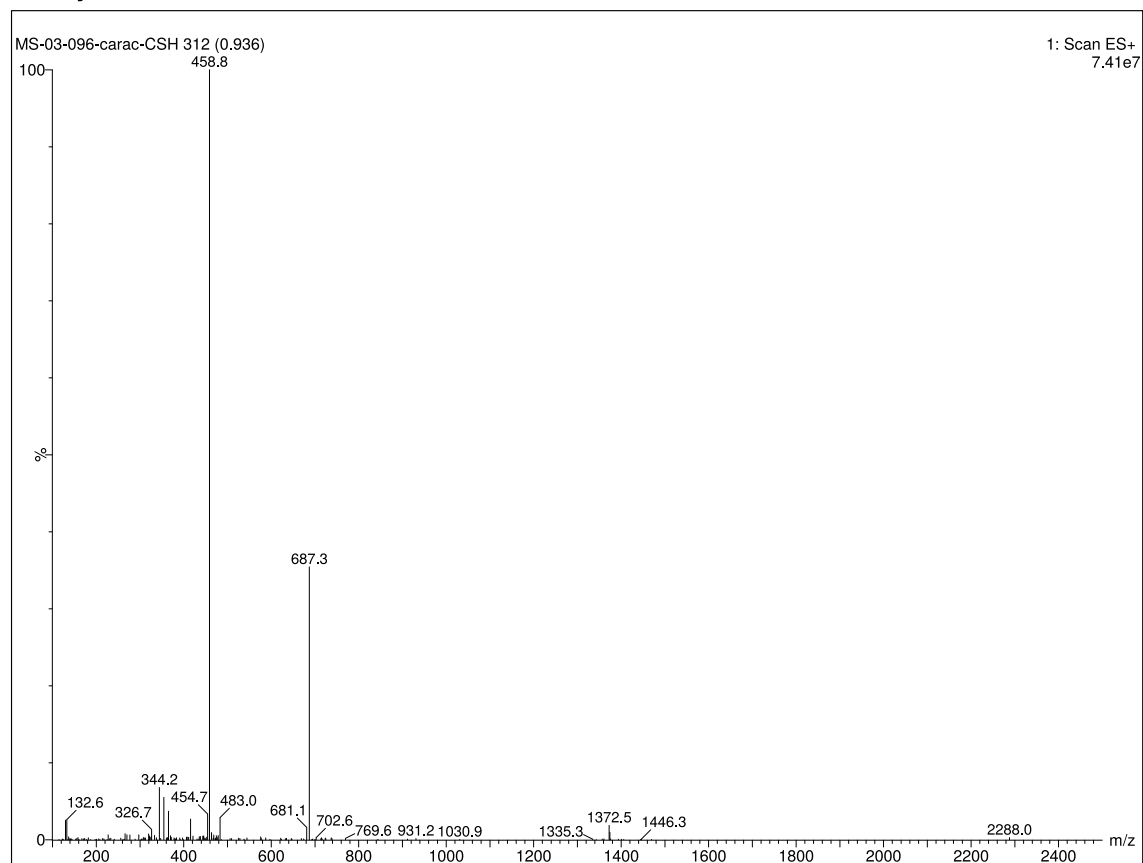
Macrocycle 3



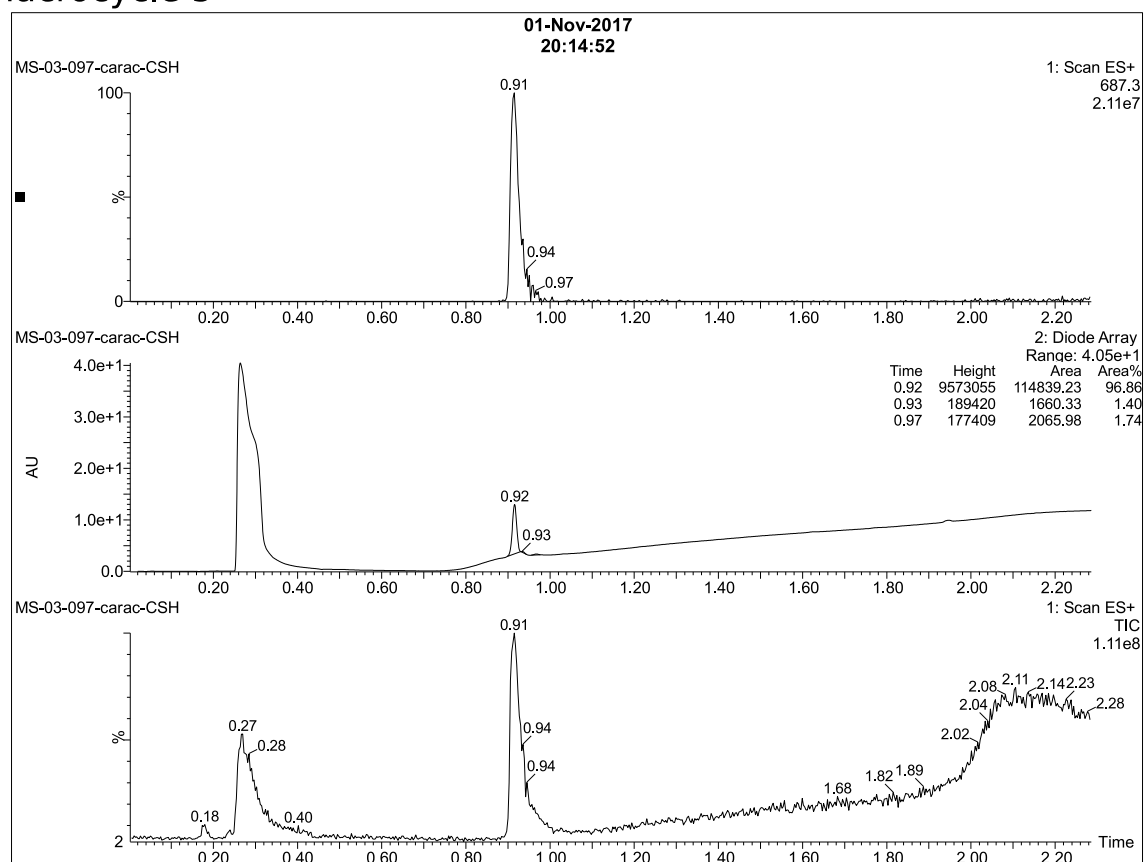
Macrocycle 4



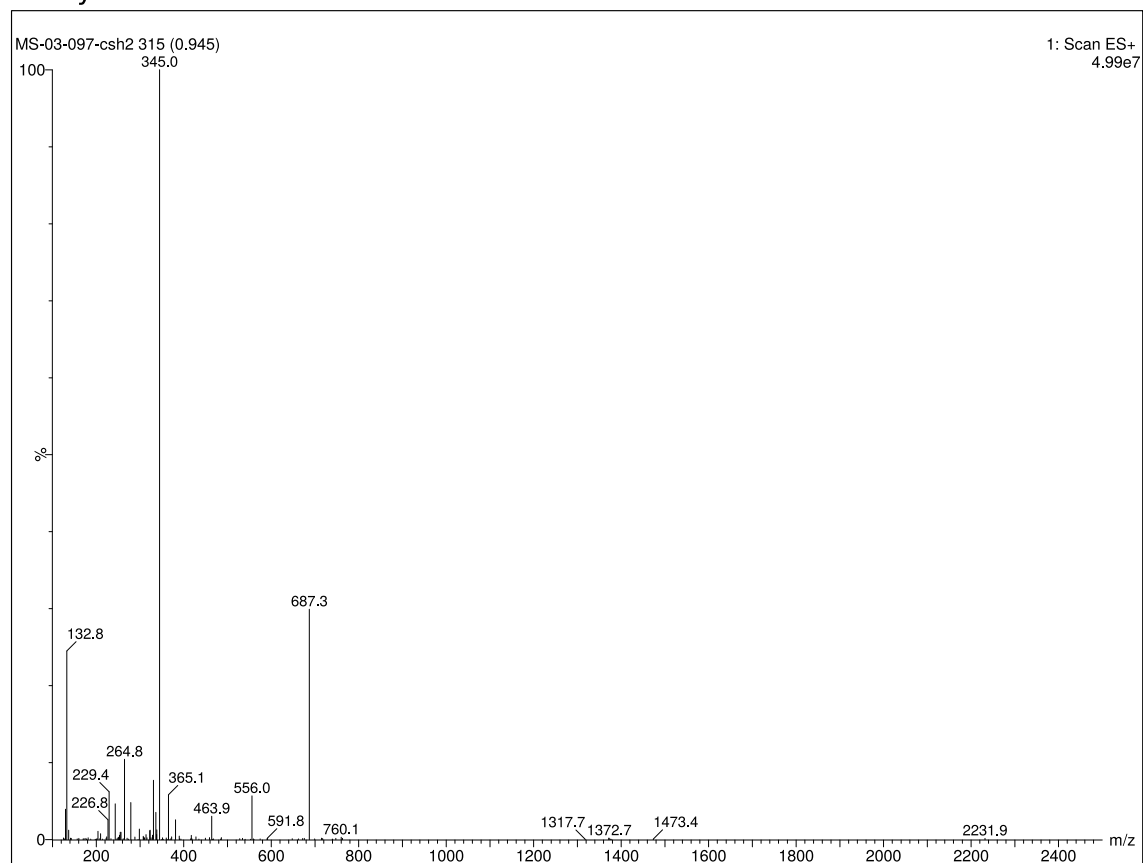
Macrocycle 4



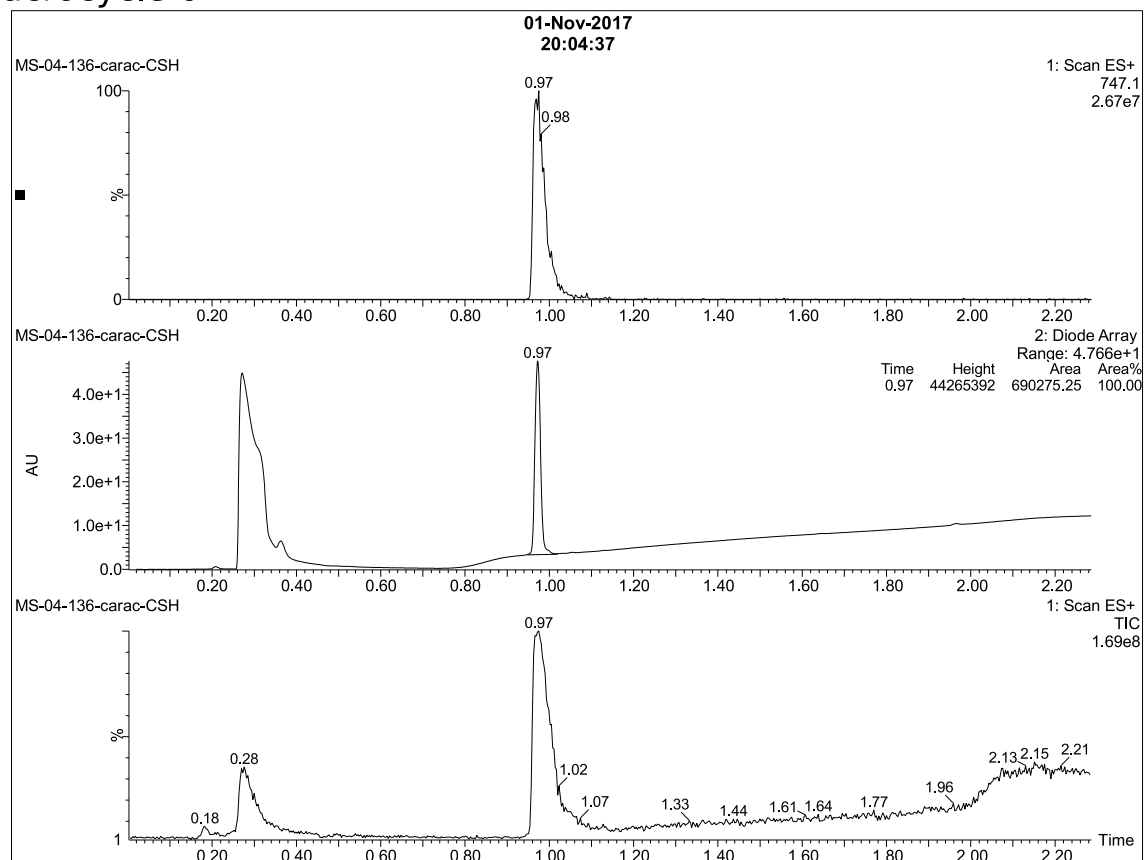
Macrocycle 5



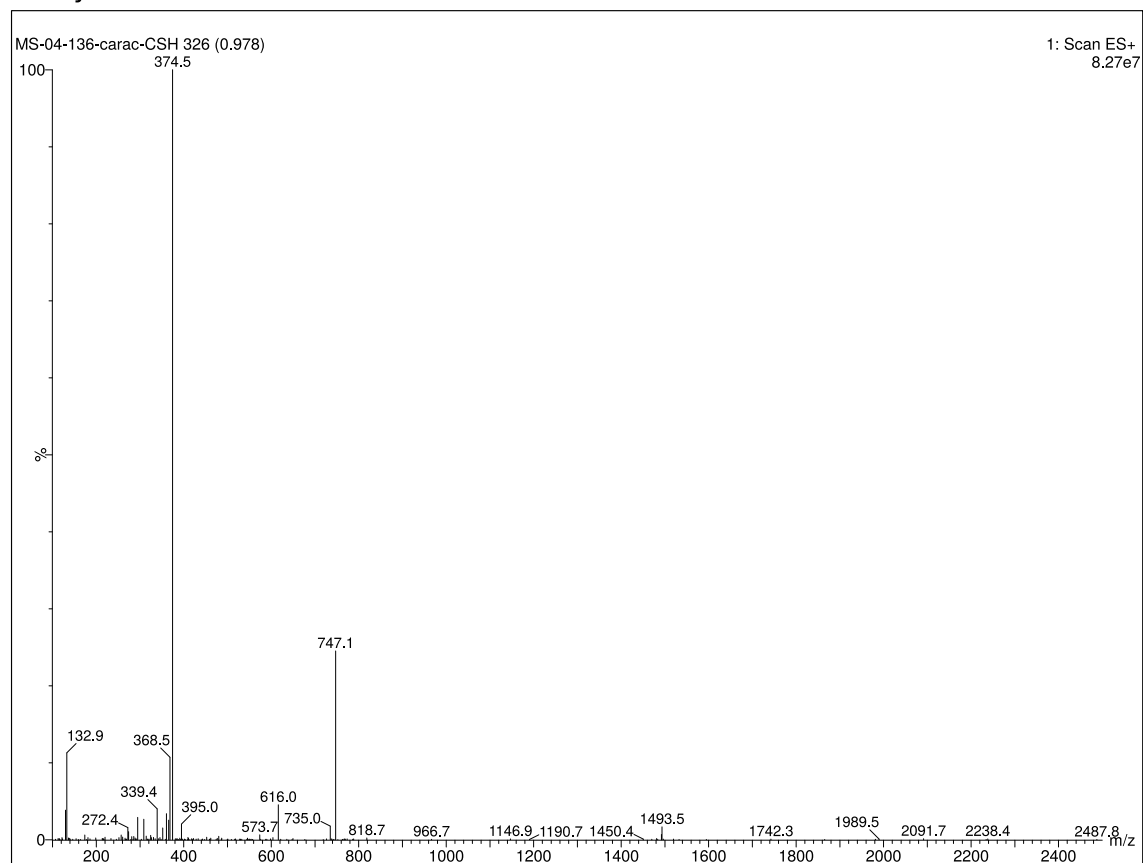
Macrocycle 5



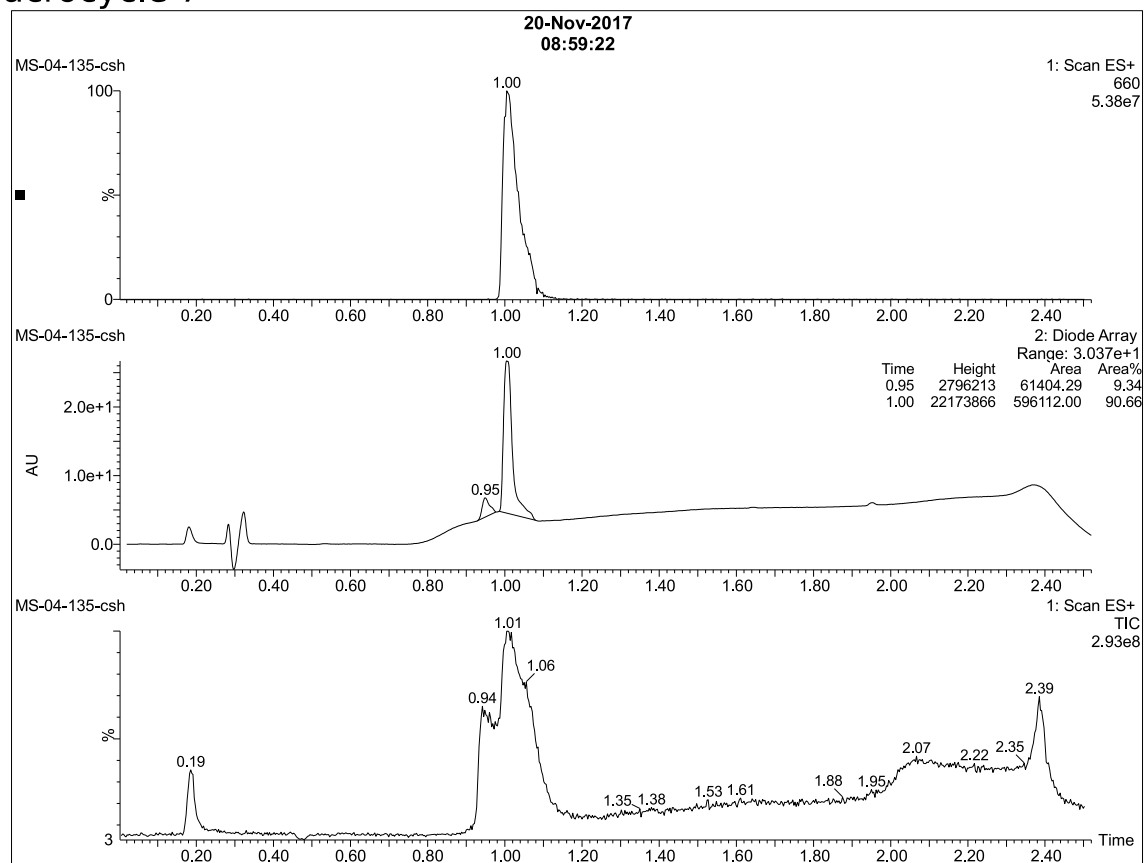
Macrocycle 6



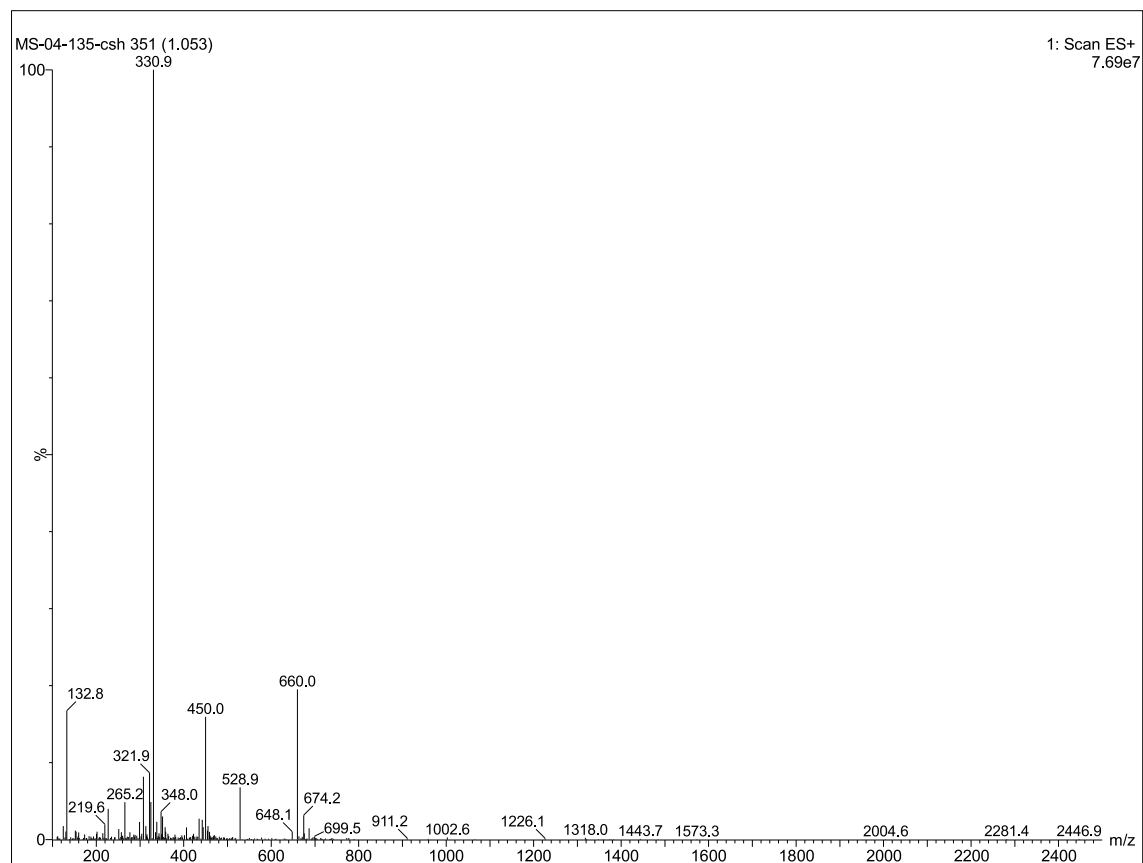
Macrocycle 6



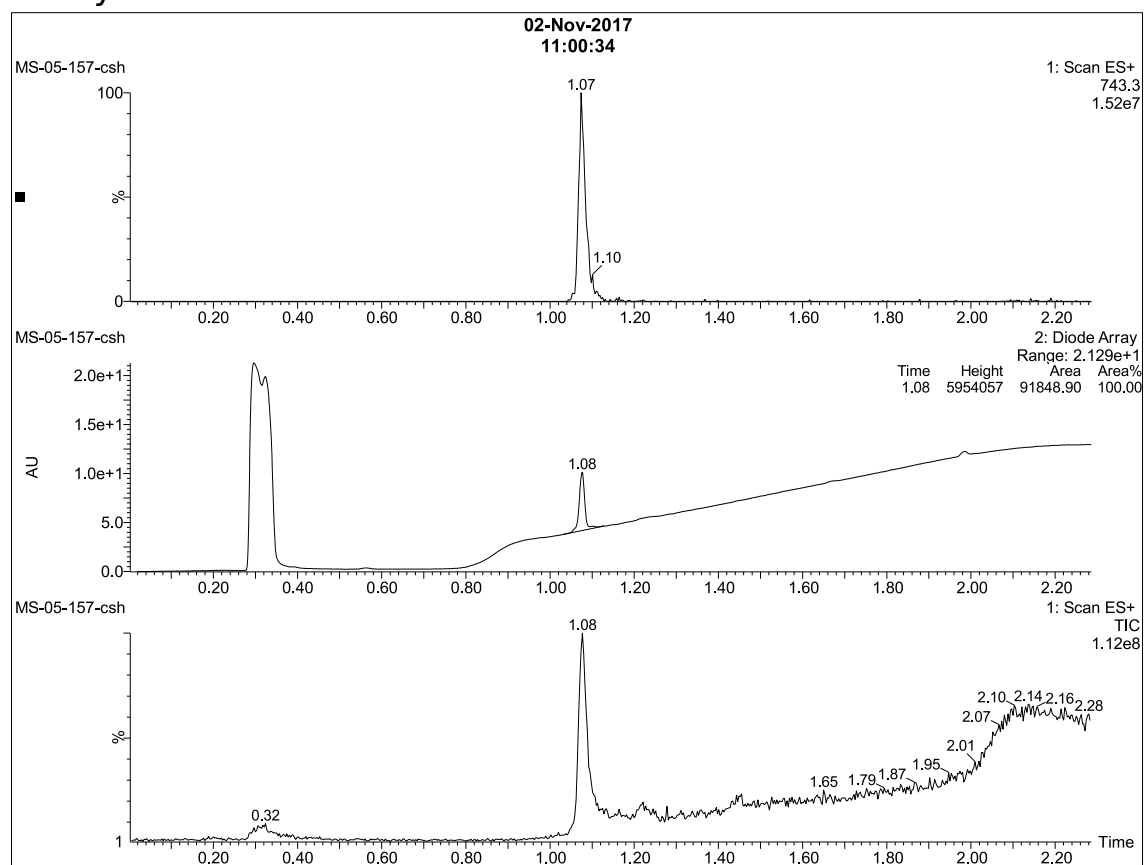
Macrocycle 7



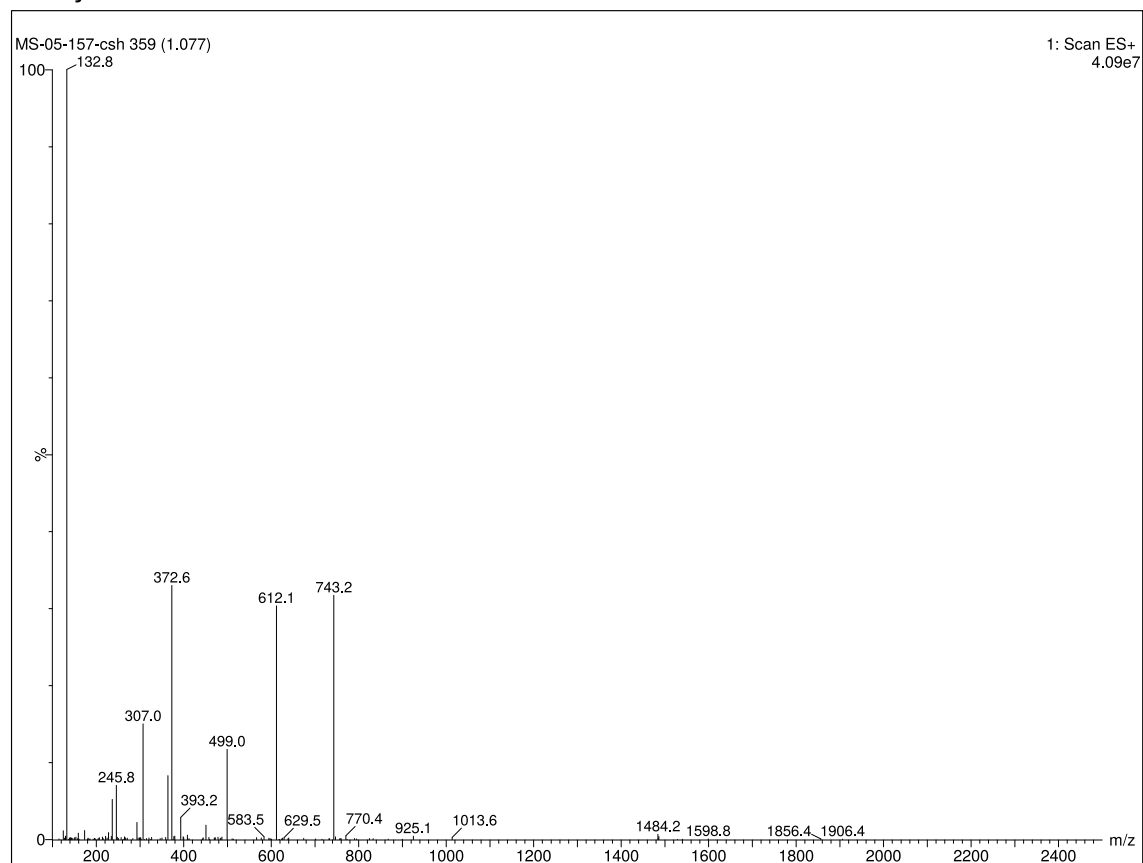
Macrocycle 7



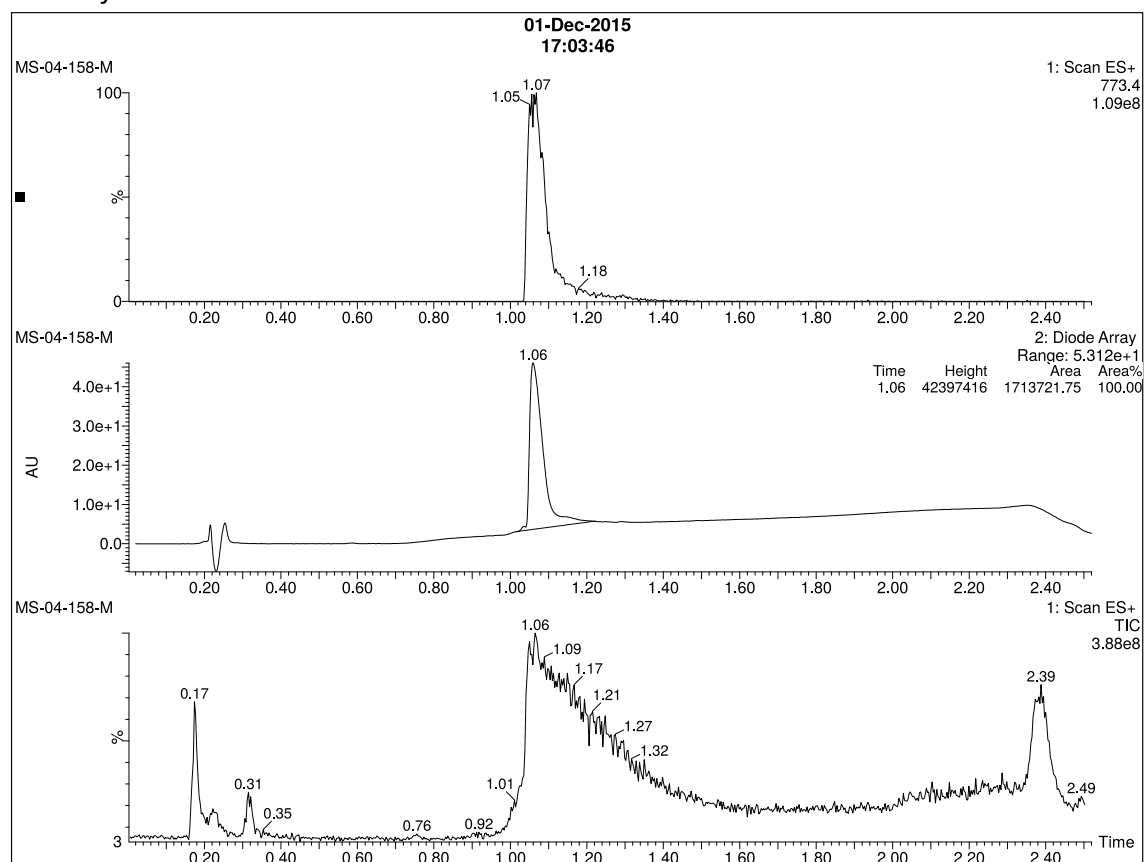
Macrocycle 8



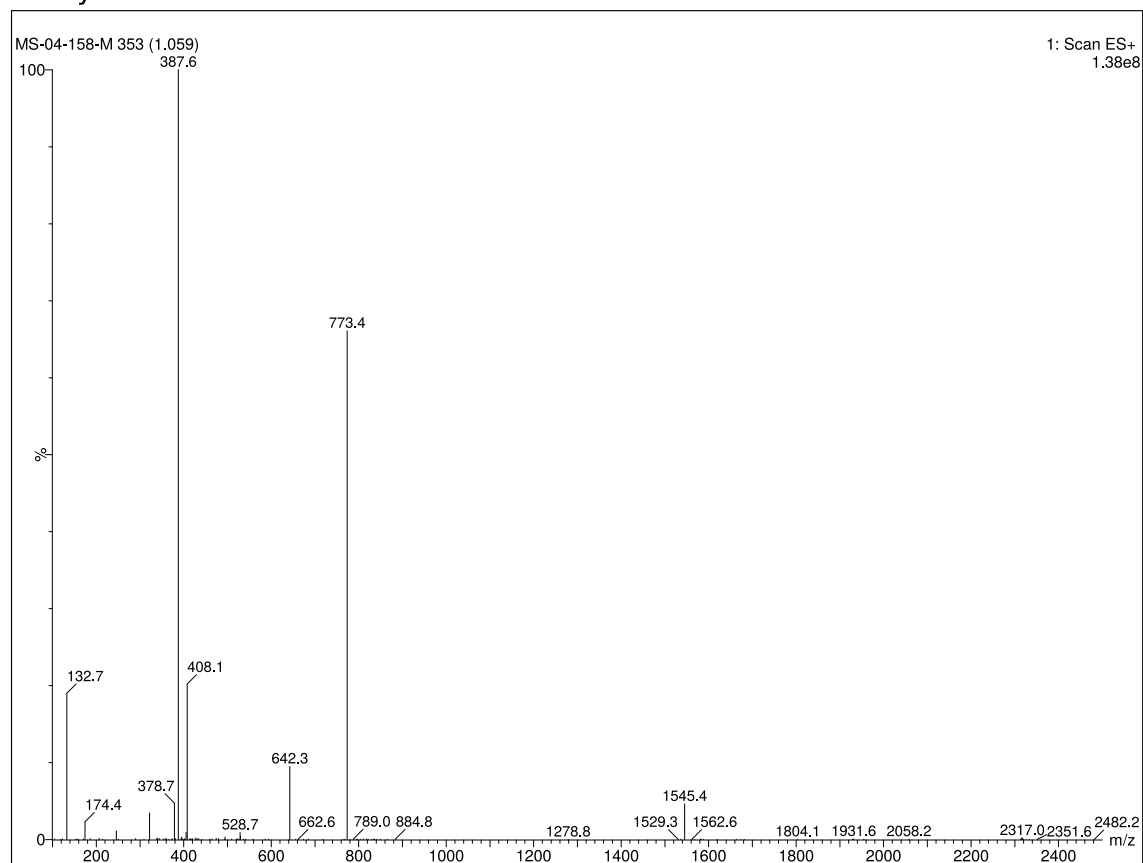
Macrocycle 8



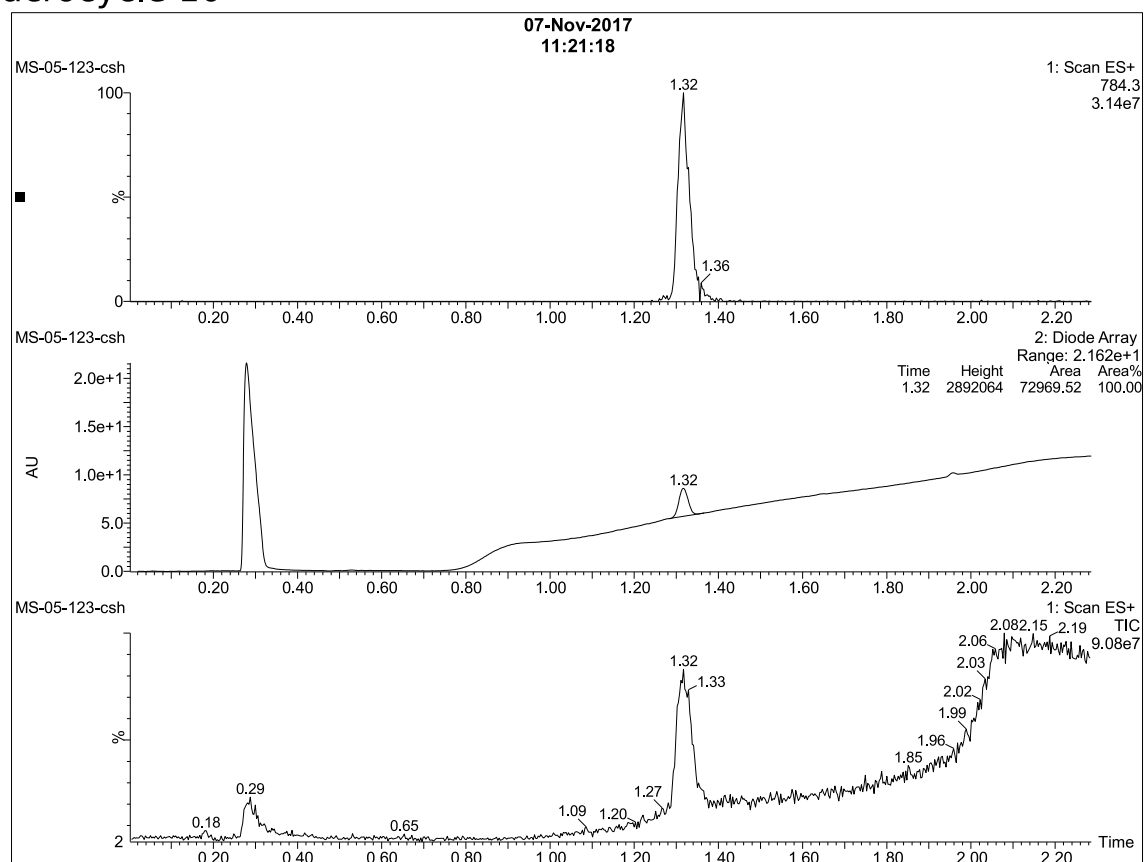
Macrocycle 9



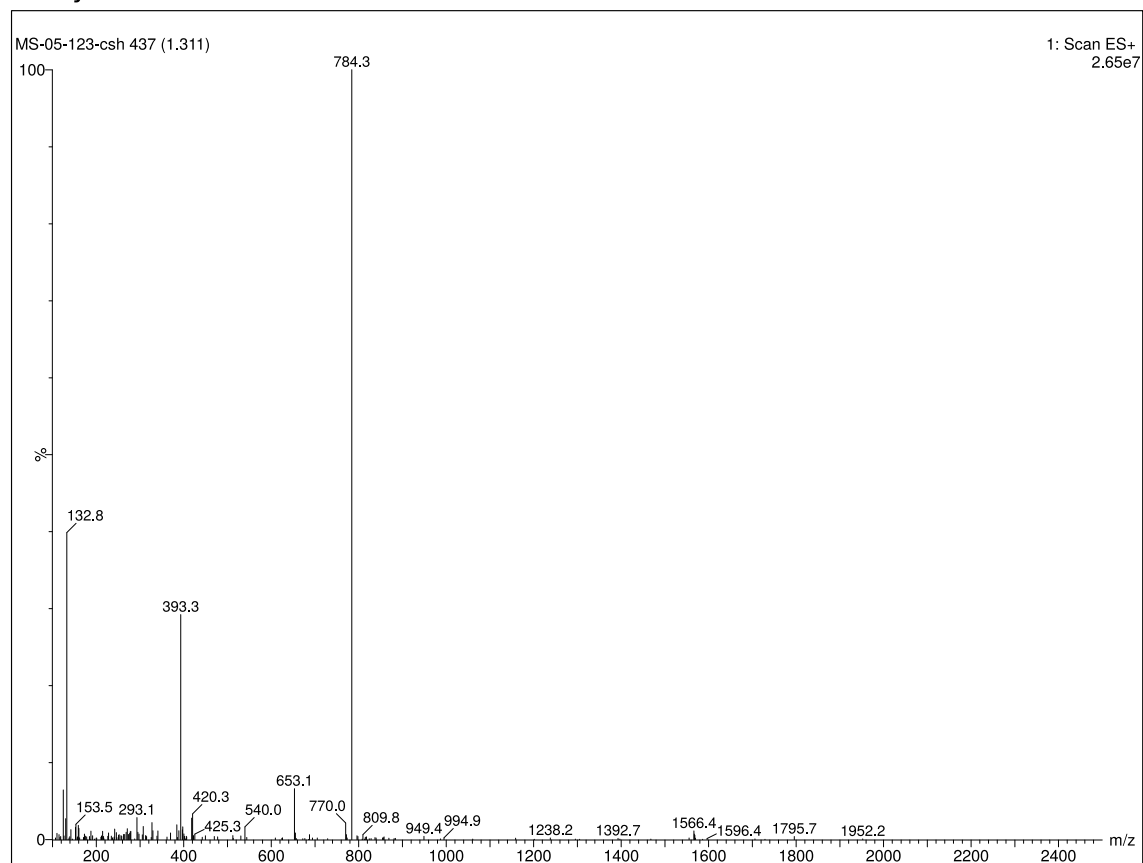
Macrocycle 9



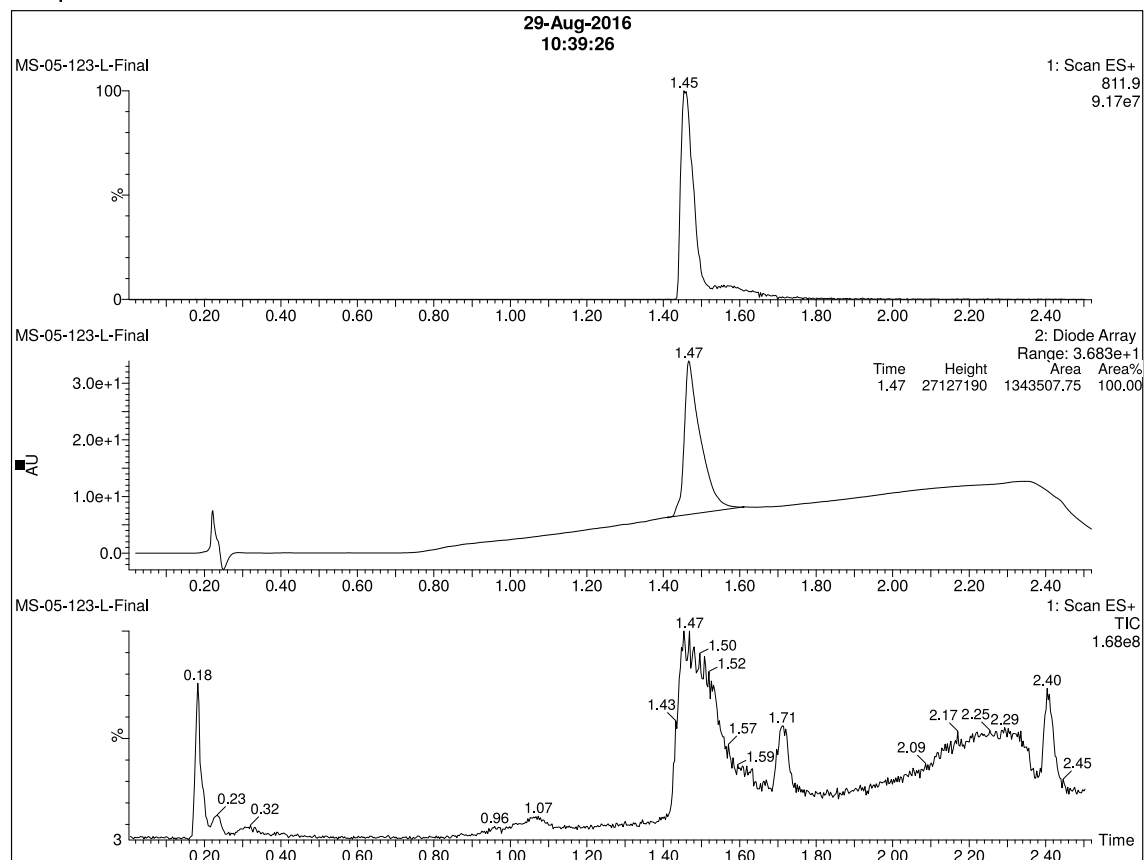
Macrocycle 10



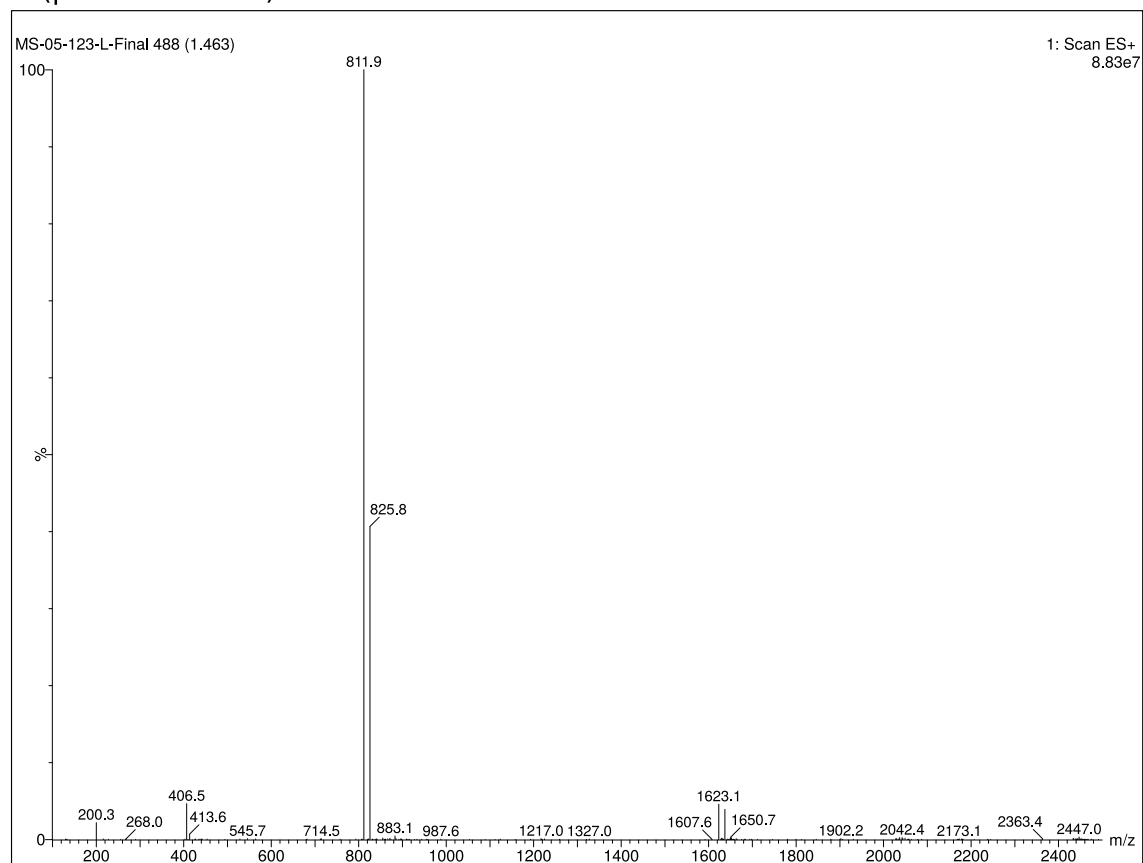
Macrocycle 10



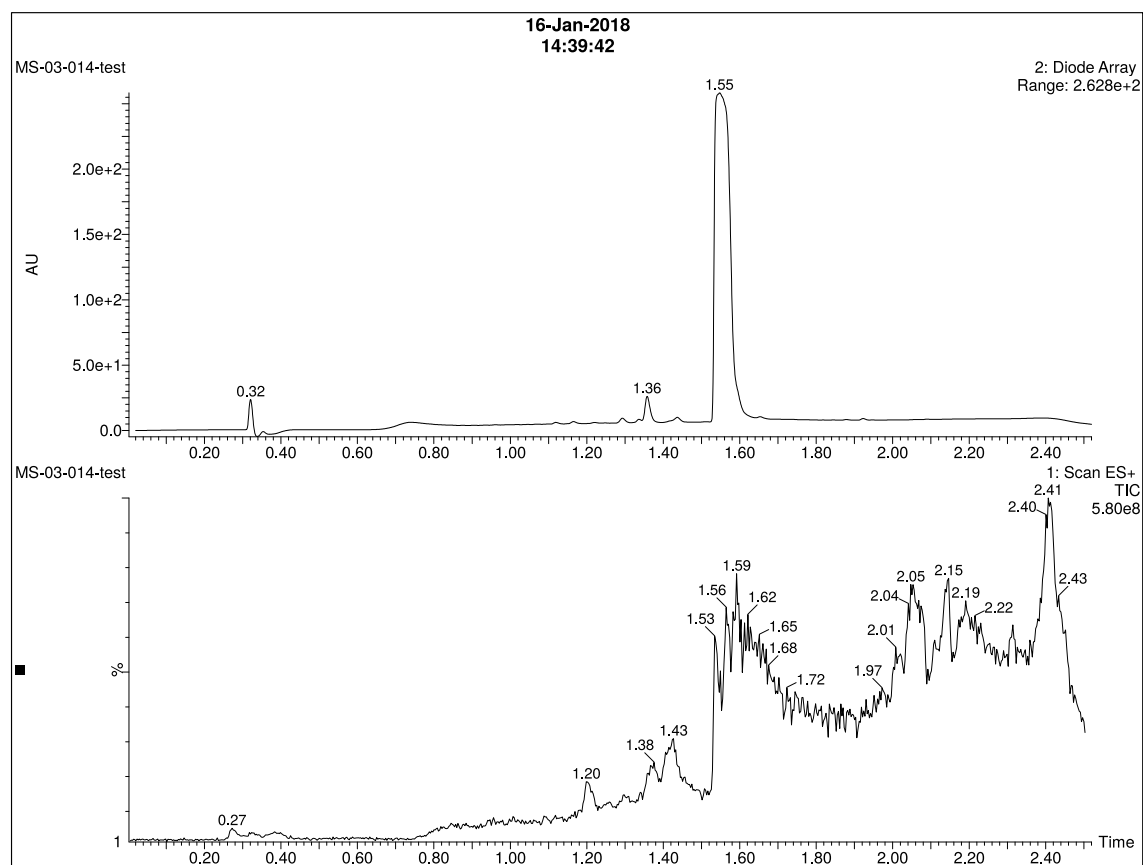
10-L (precursor of 10)



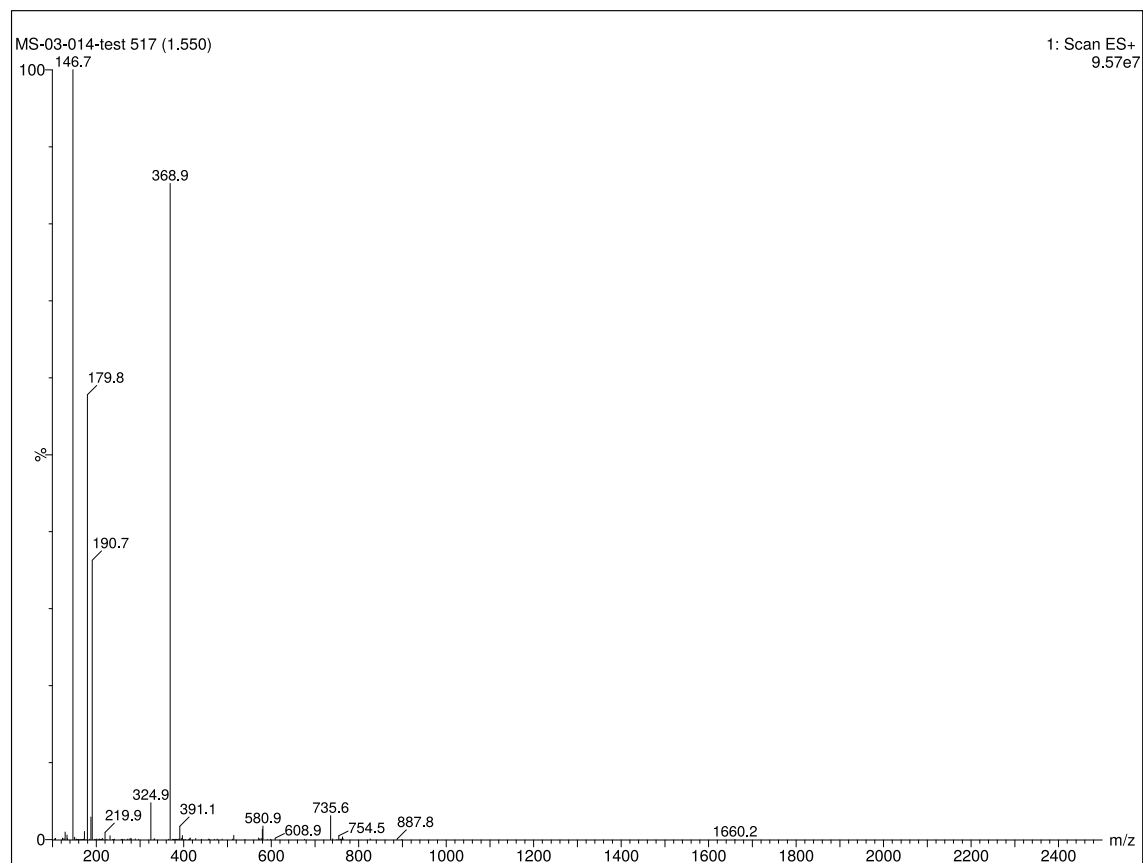
10-L (precursor of 10)



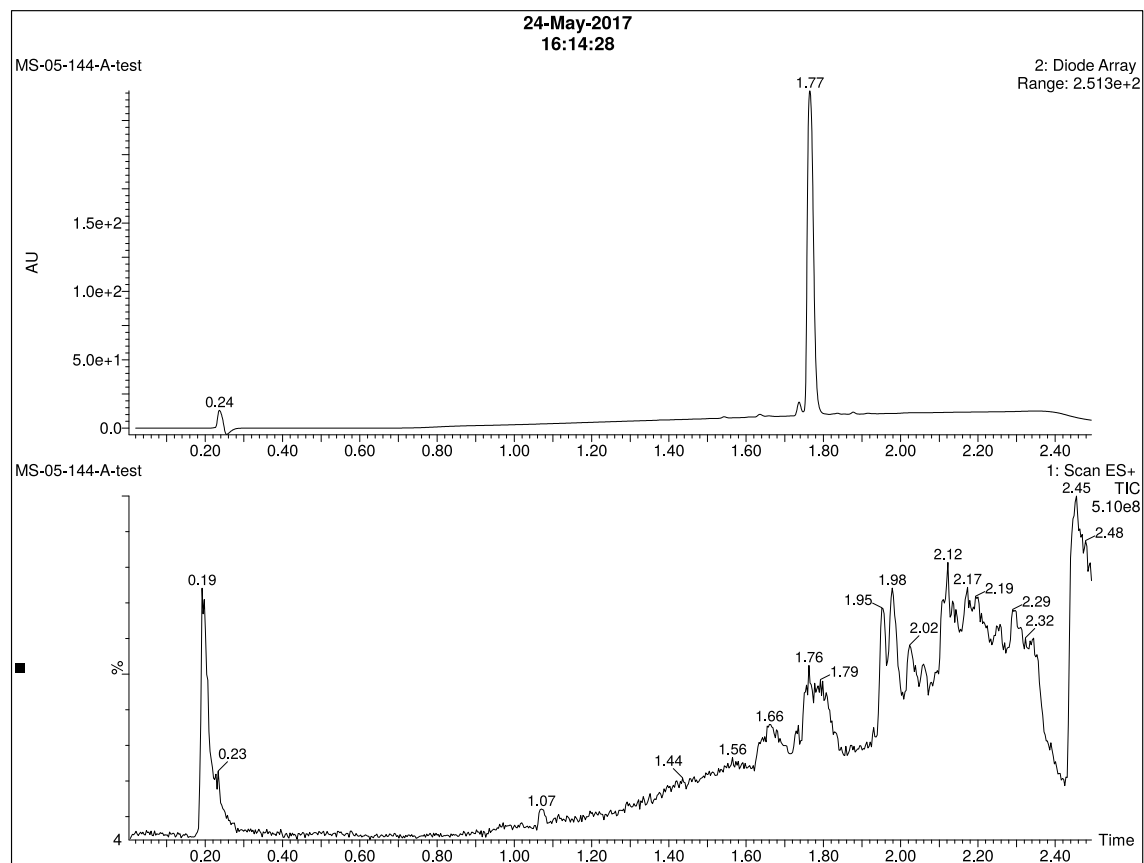
Linker A

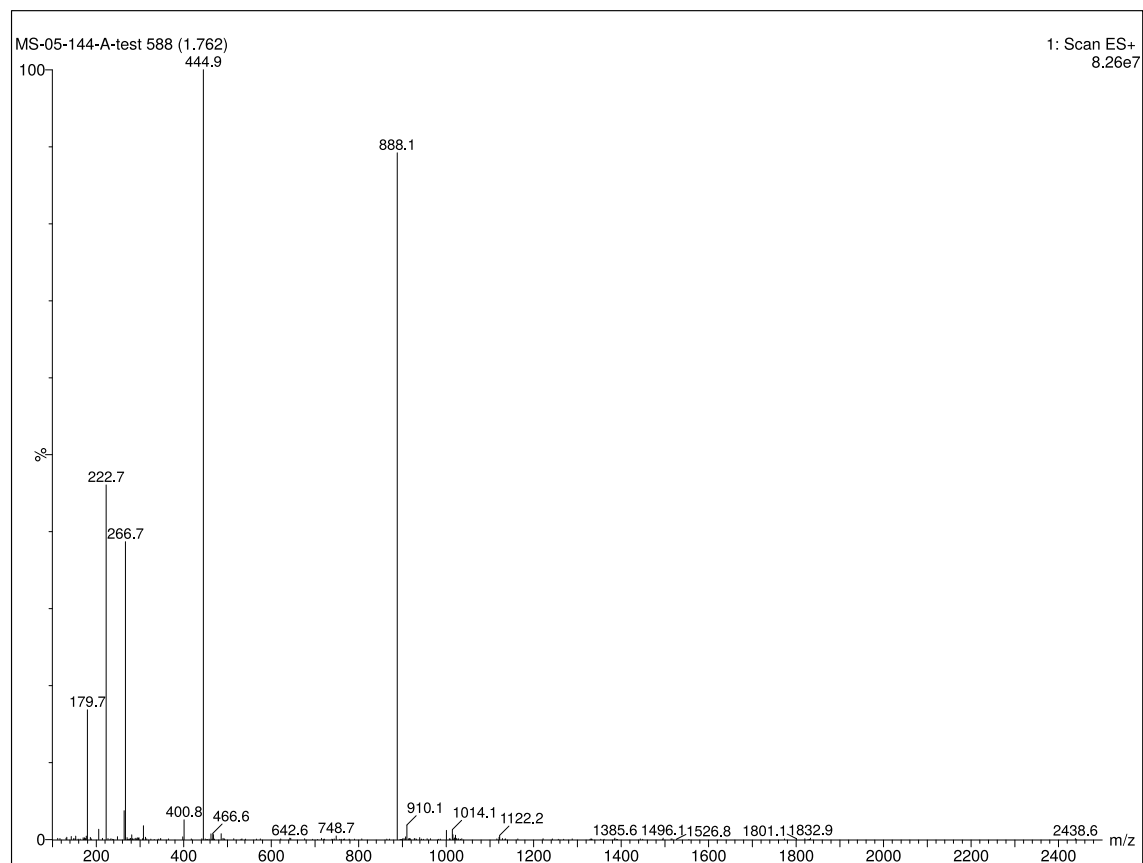


Linker A



Linker B





8.2 Annexe B : Information supplémentaire du 2^e article (Chapitre 4)

Structural Optimization and Characterization of Potent Analgesic Macrocyclic Analogues of Neurotensin 8-13

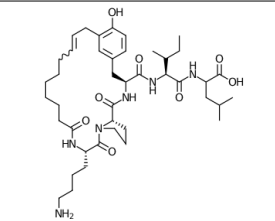
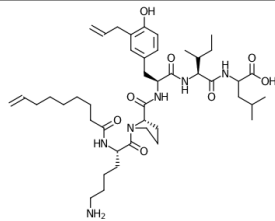
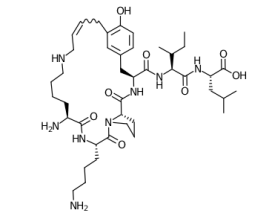
Supplementary Information

Marc Sousbie, Mélanie Vivancos, Élie Besserer-Offroy, Rebecca L. Brouillette, Jean-Michel Longpré, Richard Leduc, Philippe Sarret, and
Éric Marsault**

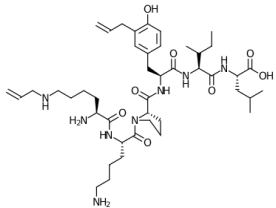
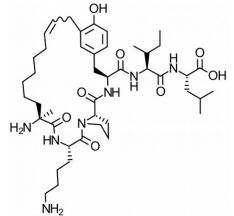
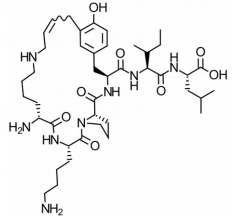
Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke,
Université de Sherbrooke, 3001 12^e Avenue Nord, Sherbrooke Qc, J1H 5N4, Canada

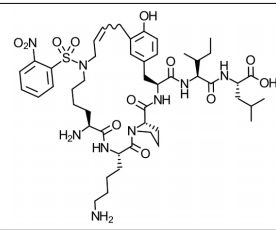
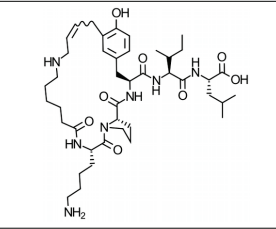
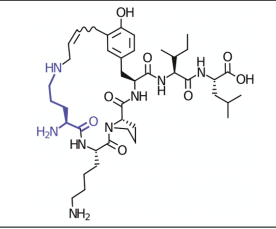
Table S1. Structures, Purities and HRMS.....	S2
Additional figures	S6
UPLC-MS Characterization	S10

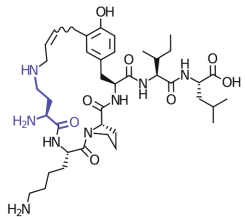
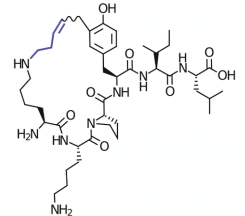
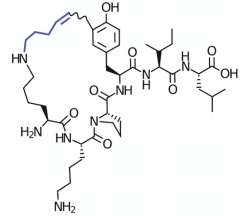
Table S1. Structures, Purities and HRMS

Code	Structure	Obtained (mg)	Molecular Formula	Molecular weight (g/mol)	Purity (%)	Exact Mass (calculated)	Exact Mass (found)	Ion
1		3.3	C ₄₂ H ₆₆ N ₆ O ₈	783.0	99	783.5015	783.5023	[M+1] ¹⁺
1-L		2.2	C ₄₄ H ₇₀ N ₆ O ₈	811.1	99	811.5328	811.5329	[M+1] ¹⁺
2		2.9	C ₄₂ H ₆₈ N ₈ O ₈	813.0	99	407.2653	407.2657	[M+2] ²⁺

S2

Code	Structure	Obtained (mg)	Molecular Formula	Molecular weight (g/mol)	Purity (%)	Exact Mass (calculated)	Exact Mass (found)	Ion
2-L		16	C ₄₄ H ₇₂ N ₈ O ₈	841.1	99	421.2809	421.2829	[M+2] ²⁺
3		5.6	C ₄₄ H ₇₁ N ₇ O ₈	826.1	99	413.7755	413.7770	[M+2] ²⁺
4		3.1	C ₄₂ H ₆₈ N ₈ O ₈	813.0	99	407.2653	407.2672	[M+2] ²⁺

Code	Structure	Obtained (mg)	Molecular Formula	Molecular weight (g/mol)	Purity (%)	Exact Mass (calculated)	Exact Mass (found)	Ion
5		7	$C_{48}H_{71}N_9O_1$ $_2S$	998.2	99	499.7544	499.7563	$[M+2]^{2+}$
6		7	$C_{42}H_{67}N_7O_8$	798.0	99	399.7598	399.7619	$[M+2]^{2+}$
7		8	$C_{41}H_{66}N_8O_8$	799.0	98	799.5076	799.5069	$[M+1]^{1+}$

Code	Structure	Obtained (mg)	Molecular Formula	Molecular weight (g/mol)	Purity (%)	Exact Mass (calculated)	Exact Mass (found)	Ion
8		4.6	C ₄₀ H ₆₄ N ₈ O ₈	785.0	99	785.4920	785.4917	[M+1] ¹⁺
9		5.5	C ₄₃ H ₇₀ N ₈ O ₈	827.1	95	827.5389	827.5388	[M+1] ¹⁺
10		9	C ₄₄ H ₇₂ N ₈ O ₈	841.1	99	841.5546	841.5547	[M+1] ¹⁺

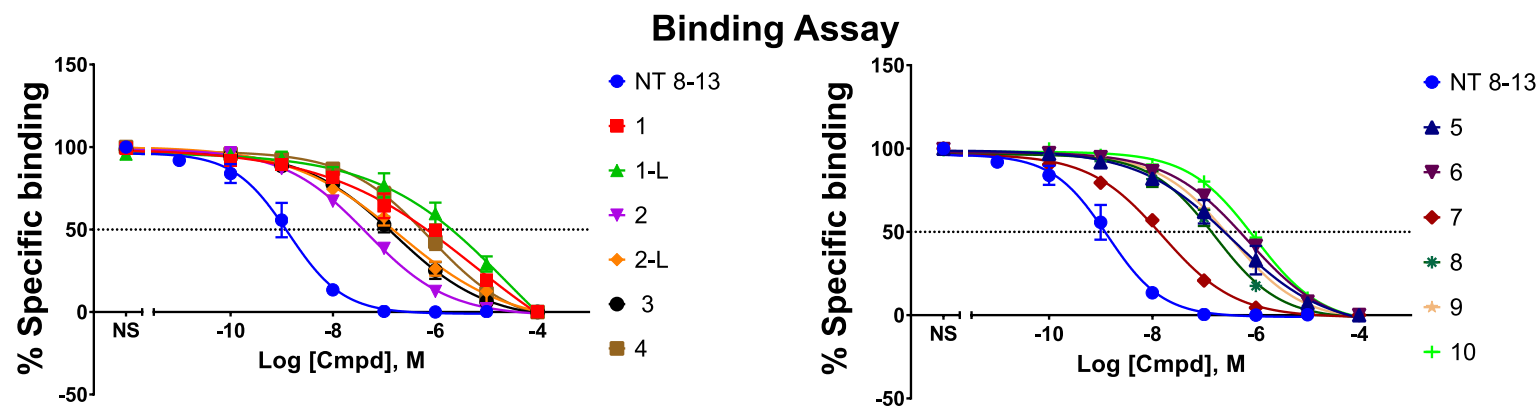


Figure S1. Binding affinity assay curves for all compounds

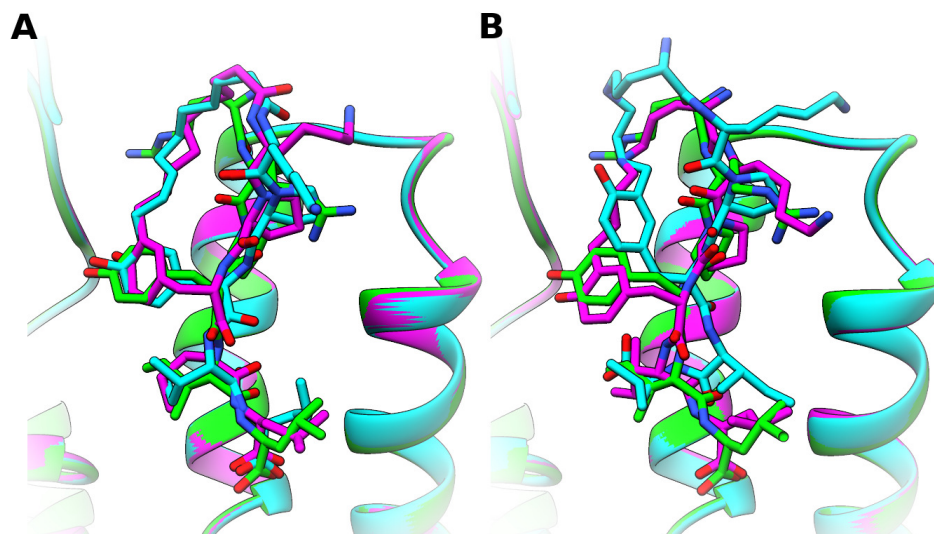


Figure S2. Comparison of the docking of Cis and Trans isomers for compound 1 (A) and compound 7 (B). Green: hNTS1 homology model based on pdb 4grv; Cyan: Cis isomer; Magenta: Trans isomer.

Figure S3: Saturation of ^{125}I -[Tyr³]NT binding to membrane preparation of CHO-K1 cells stably expressing the hNTS1 receptor. K_D and B_{\max} values derived from the specific binding curves were found to be 0.81 ± 0.07 nM and 49.2 ± 0.9 pmol/mg protein, respectively.

Saturation binding of ^{125}I -[Tyr³]-Neurotensin

Radioligand saturation binding experiments were performed by incubating cell membranes expressing either of CHO-K1 cells stably expressing the human NTS1 receptor with dilutions of ^{125}I -[Tyr³]NT (200 Ci/mmol, ranging from 50 to 0.05 nM) in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.2% BSA) for 30 min at 25 °C. After incubation, the binding reaction mixture was transferred in polyethylenimine-coated 96 well filter plates (Millipore, Billerica, MA). Reaction was terminated by filtration and plates were washed three times with 200 µL of ice-cold binding buffer. Glass fiber filters were then counted in a γ-counter. Non-specific binding was measured in the presence of 10^{-5} M unlabeled NT [8-13]. Data were plotted using GraphPad Prism 7 using the One-site – Specific binding and represented the mean ± SEM of at least three separate experiments.

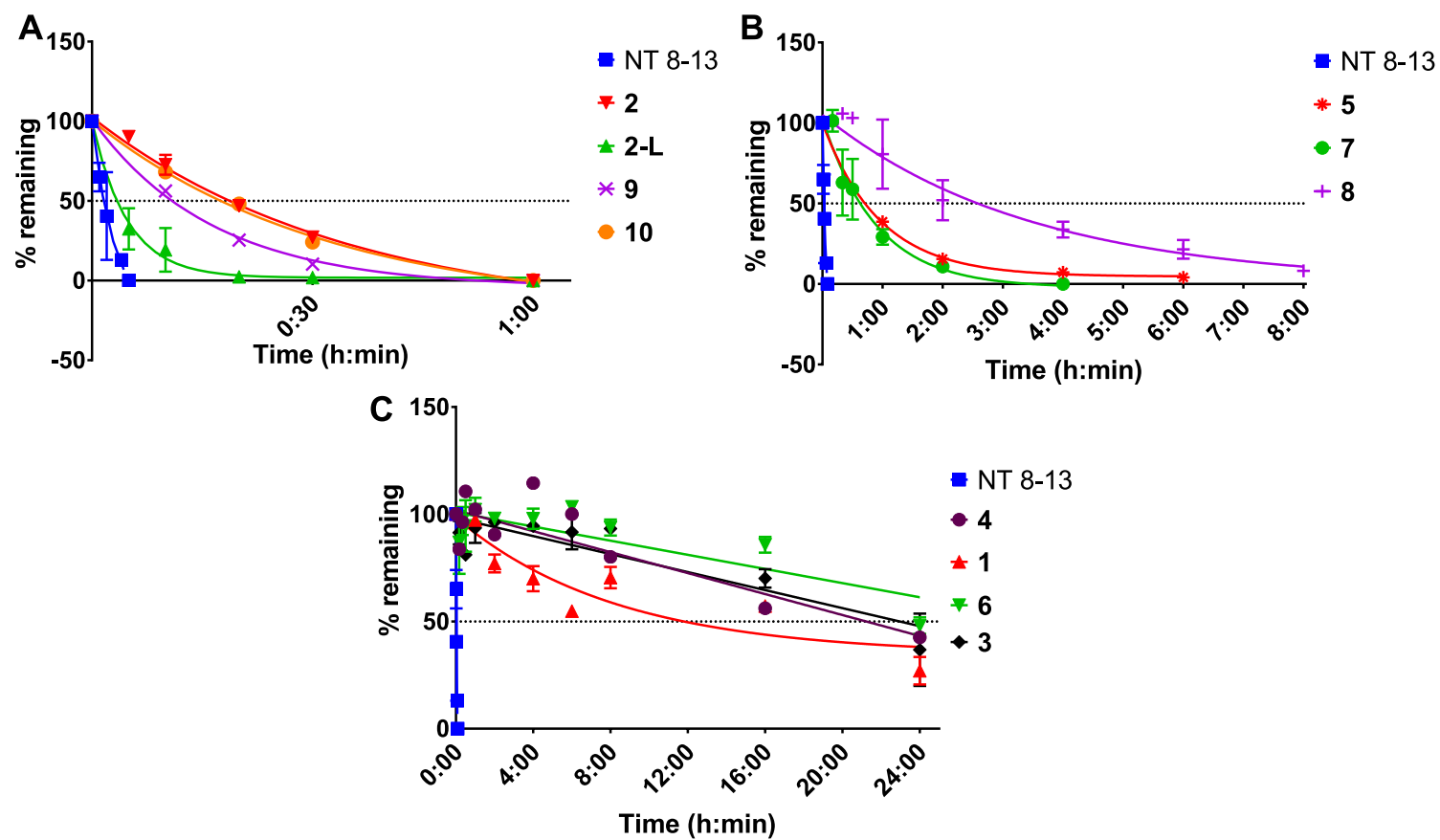


Figure S4. Degradation of compounds during incubation in rat plasma.

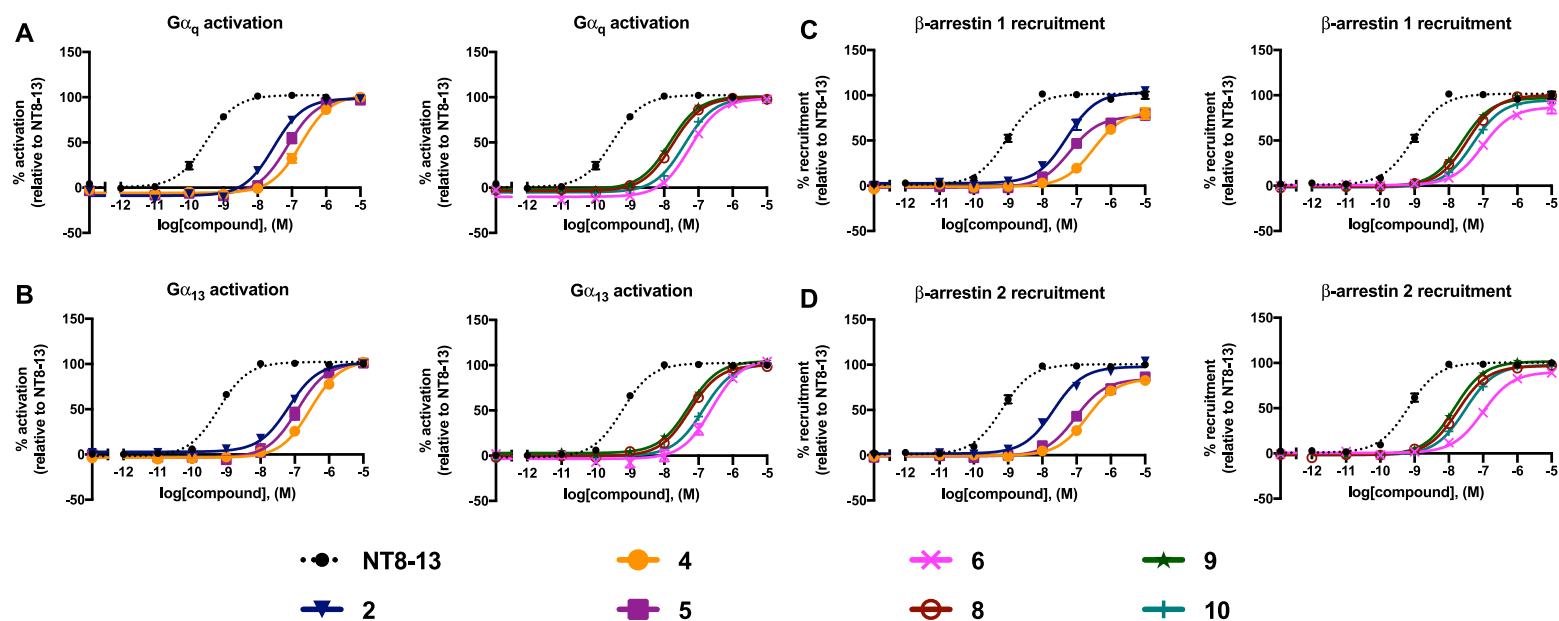
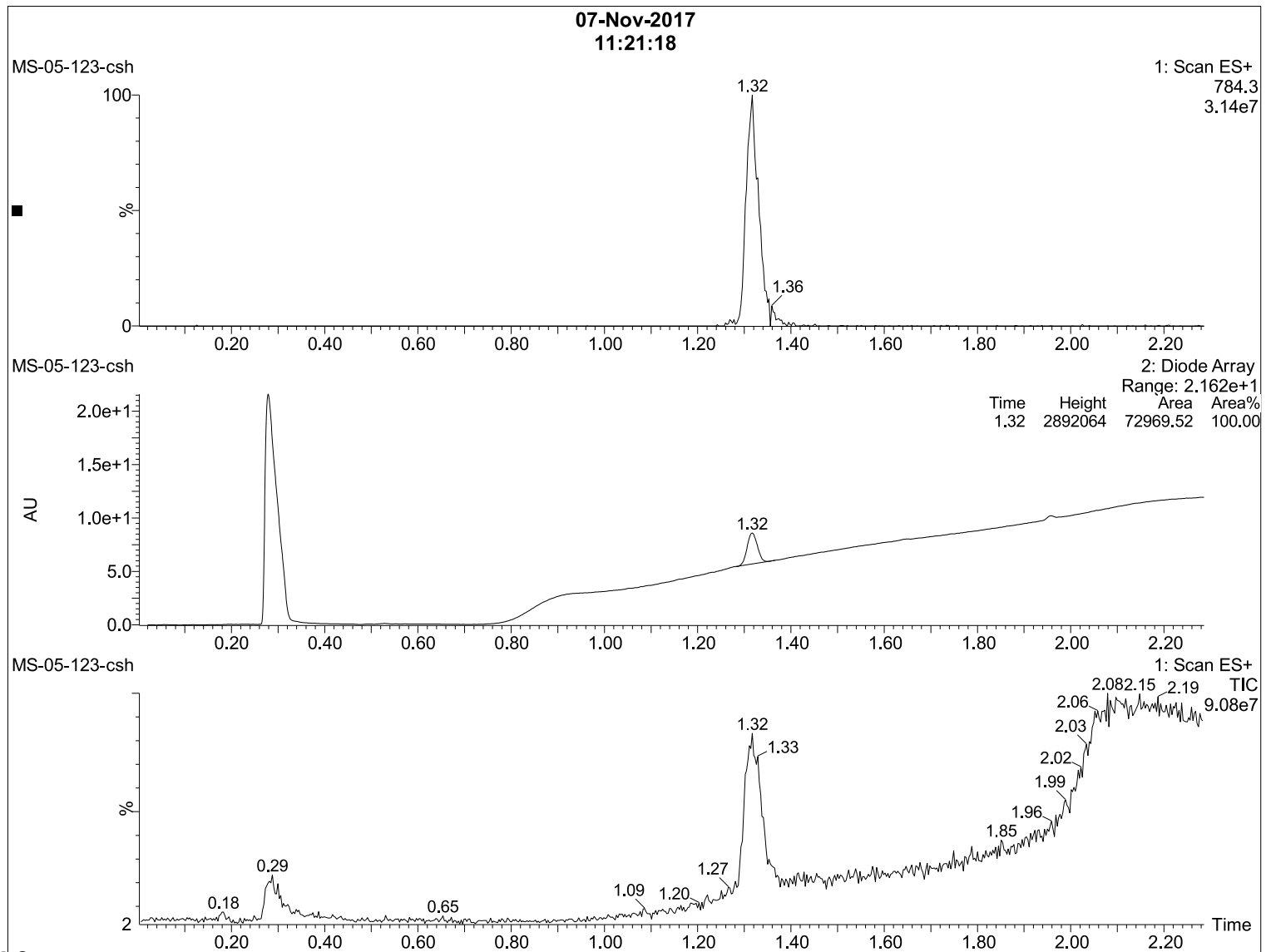


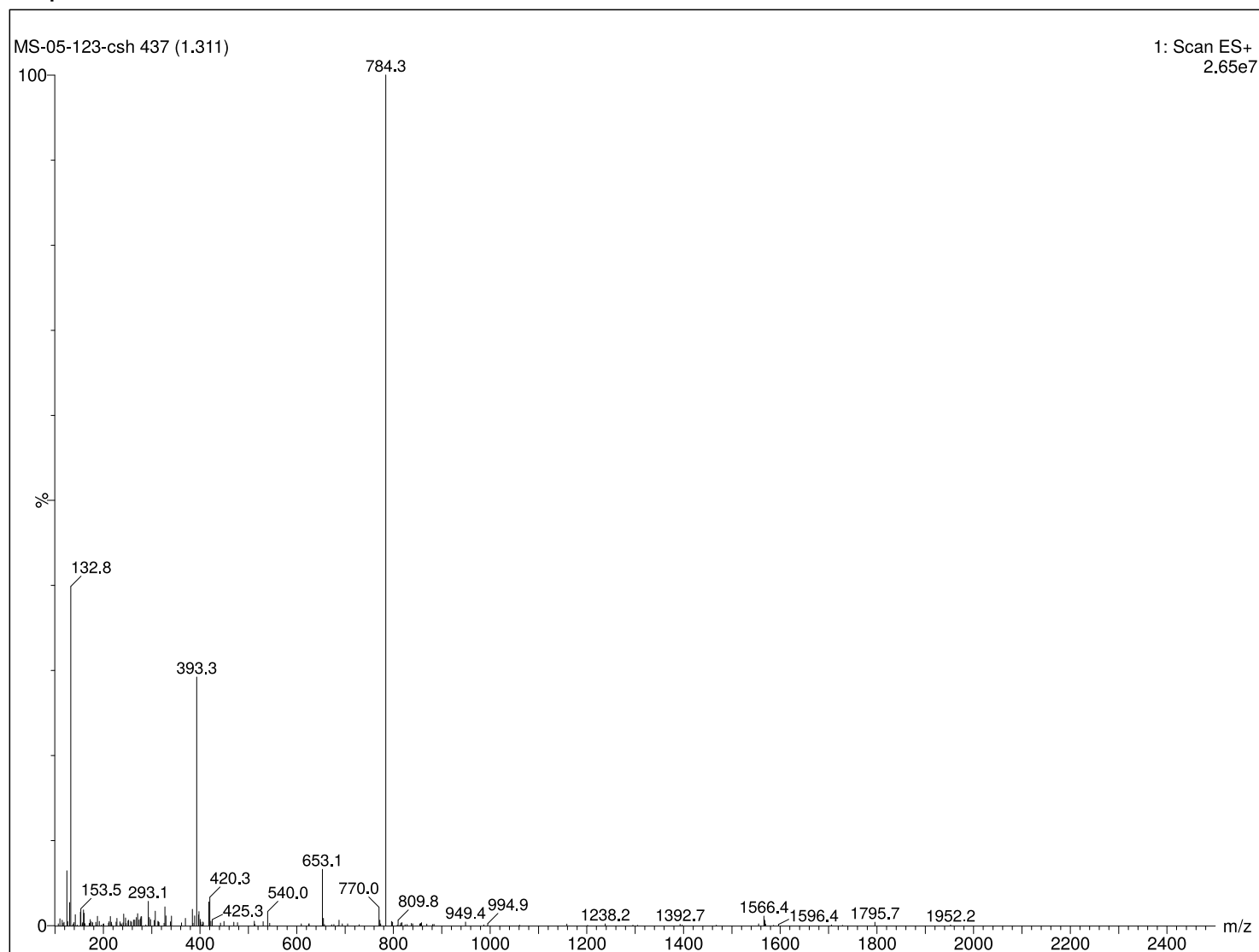
Figure S5. In vitro signaling profiles of macrocycles 2, 4, 5, 6, 8, 9, and 10. Activation of $G\alpha_q$ (A) and $G\alpha_{13}$ (B) proteins and recruitment of β -arrestins 1 (C) and 2 (D) to the hNTS1 receptor in response to compound stimulation, as monitored by BRET in transiently-transfected CHO cells. Assays were performed three times, in triplicate. Error bars represent mean \pm SEM.

Compound 1



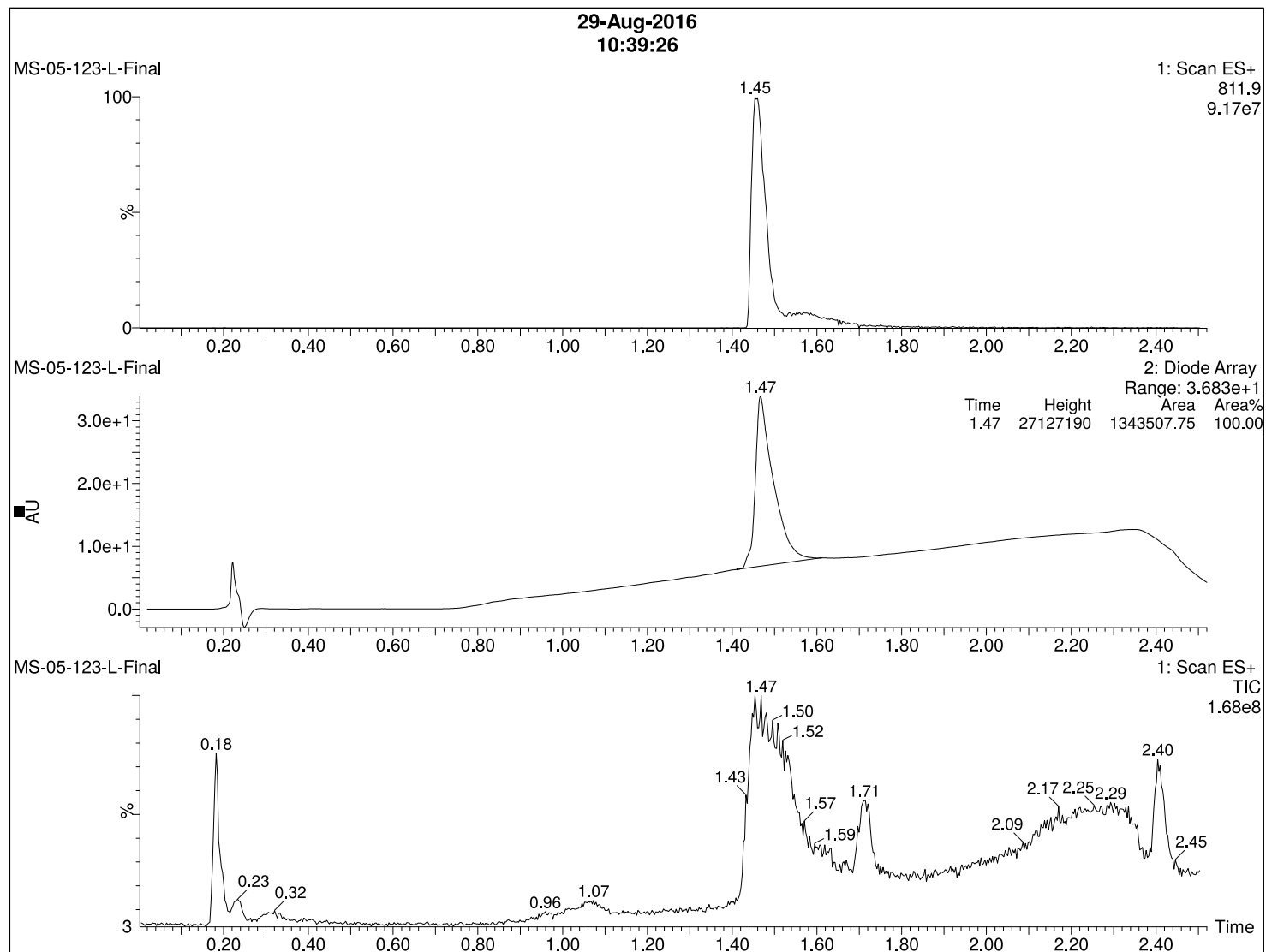
S10

Compound 1



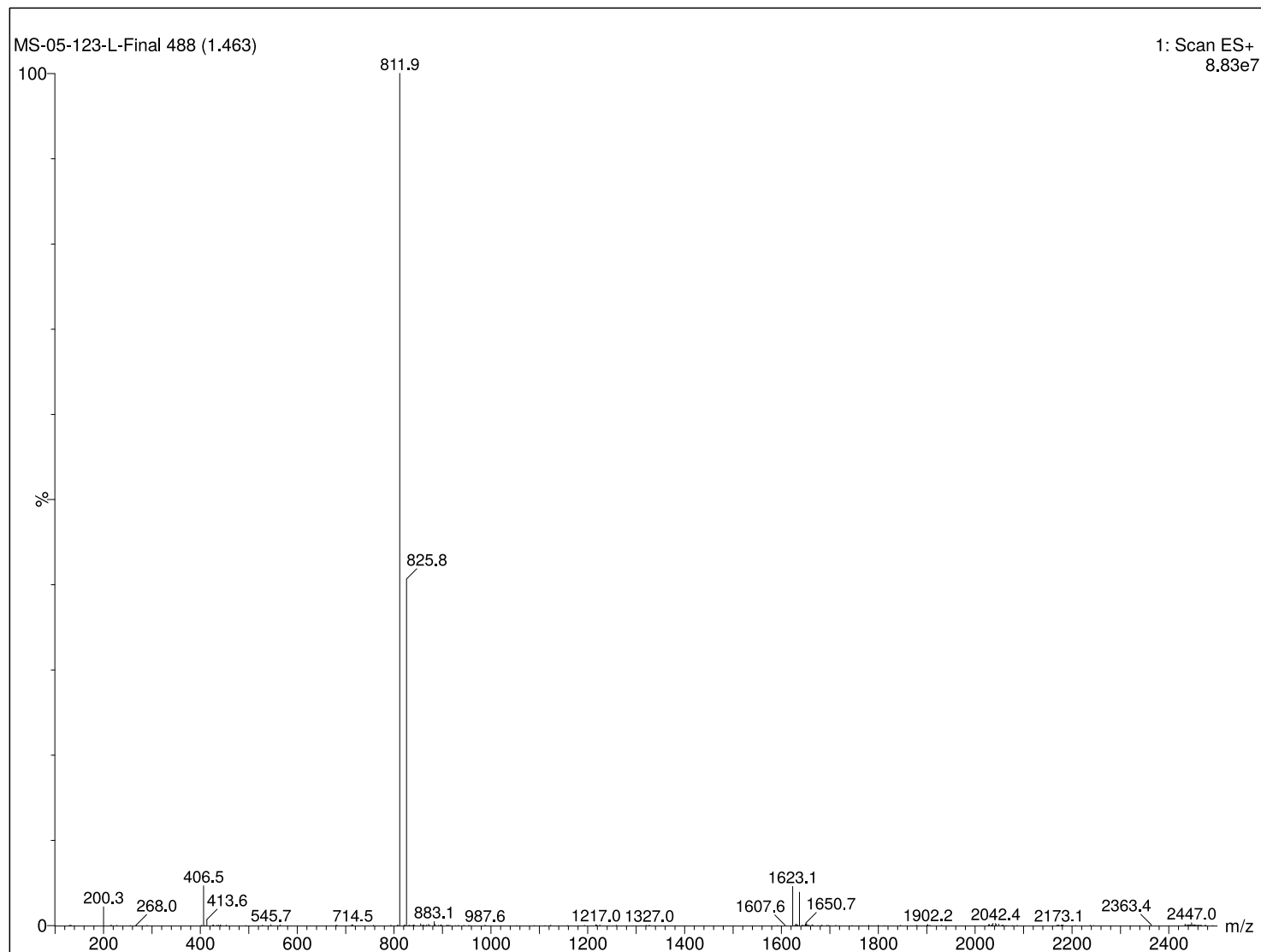
S11

Compound 1-L (linear analogue of 1)



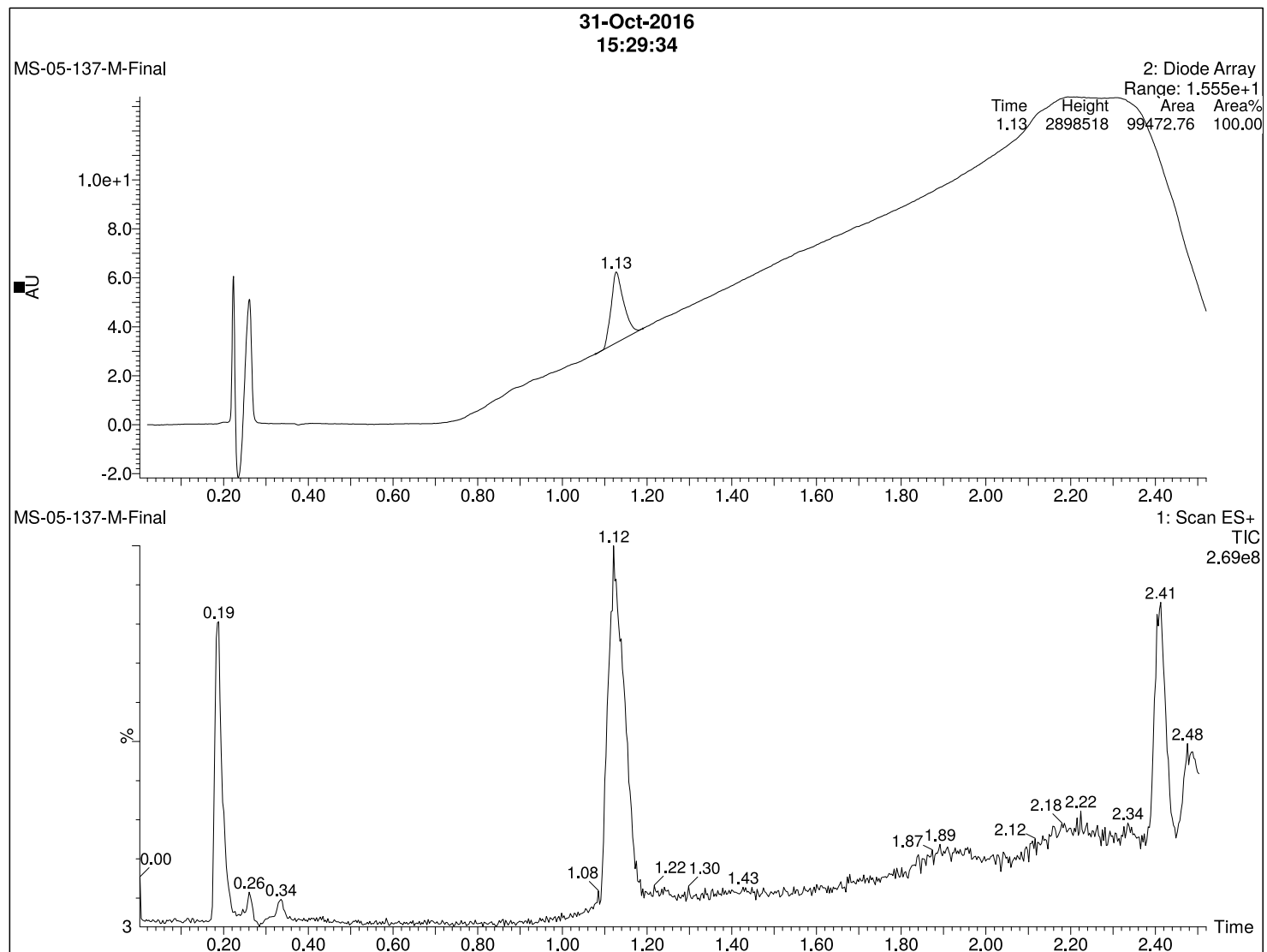
S12

Compound 1-L (Linear analogue of 1)



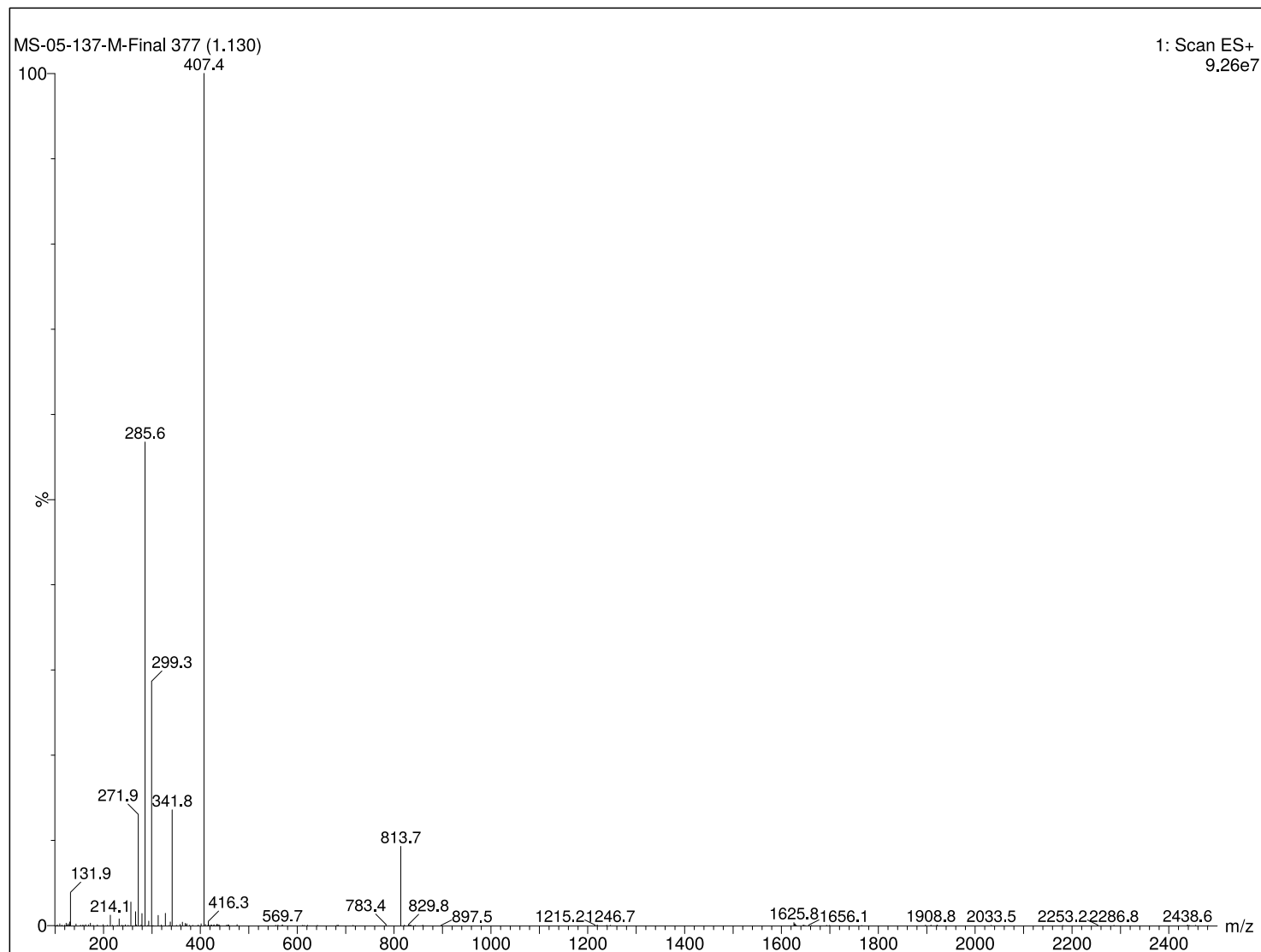
S13

Compound 2



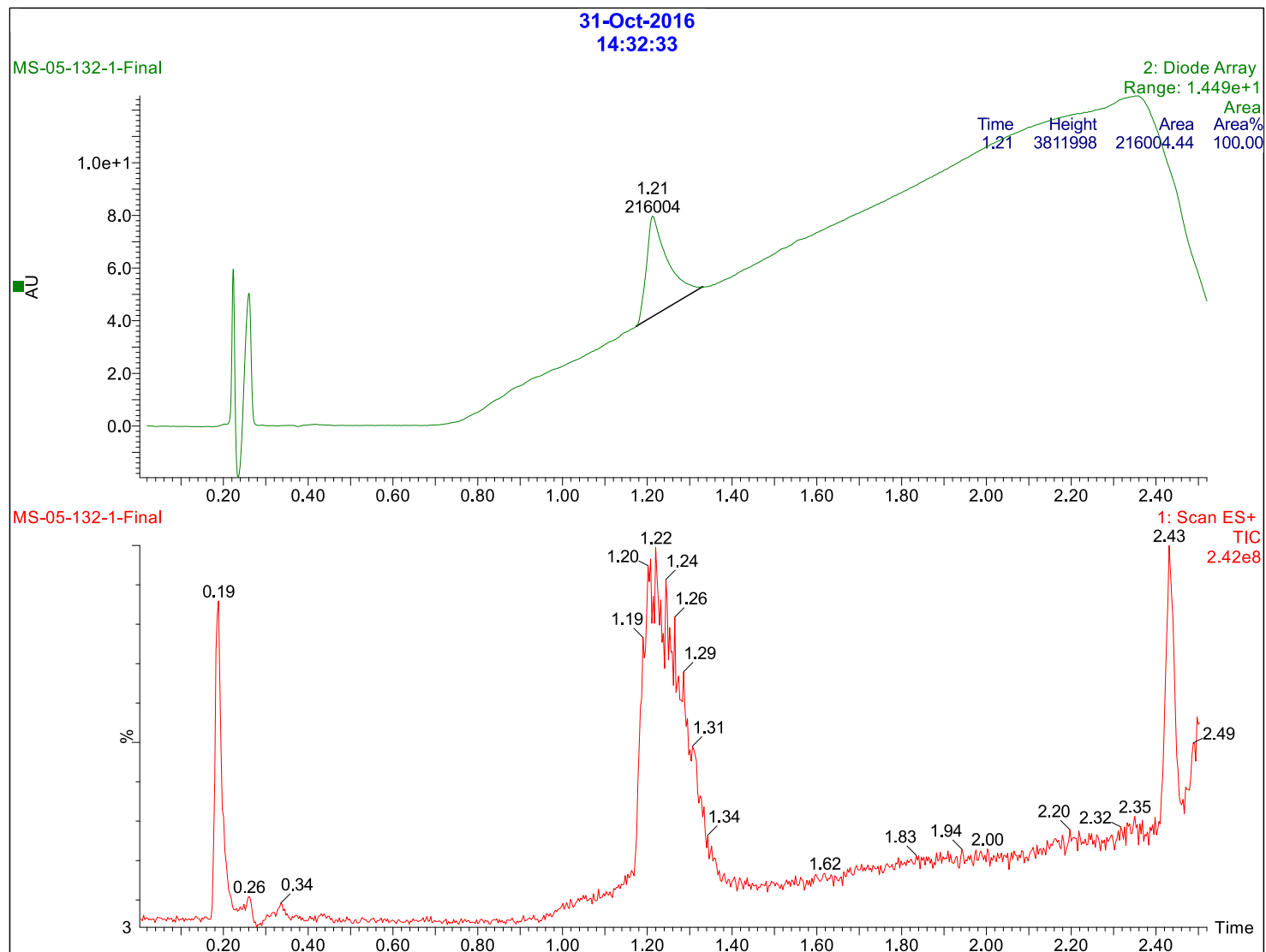
S14

Compound 2



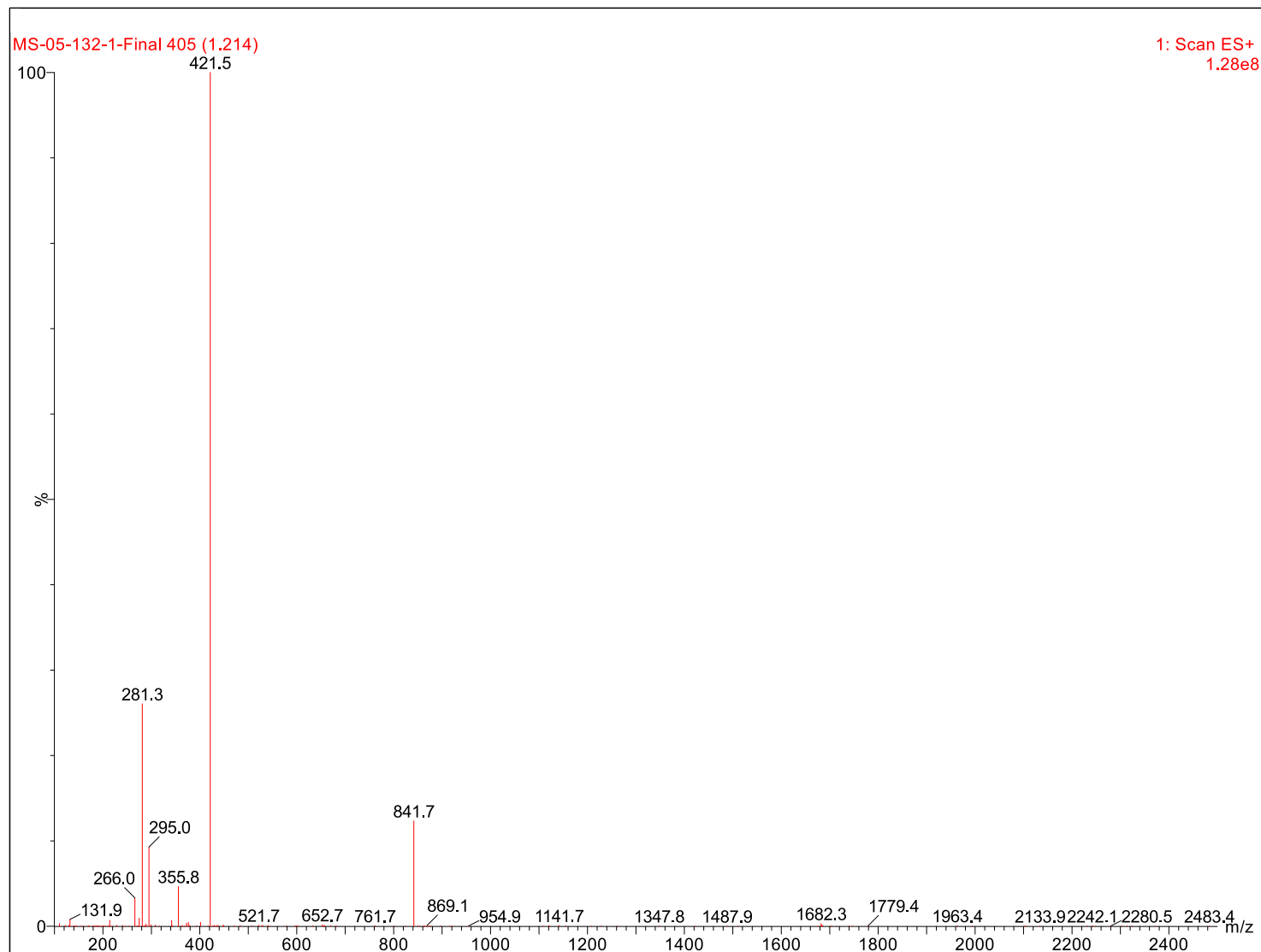
S15

Compound 2-L (linear analogue of 2)



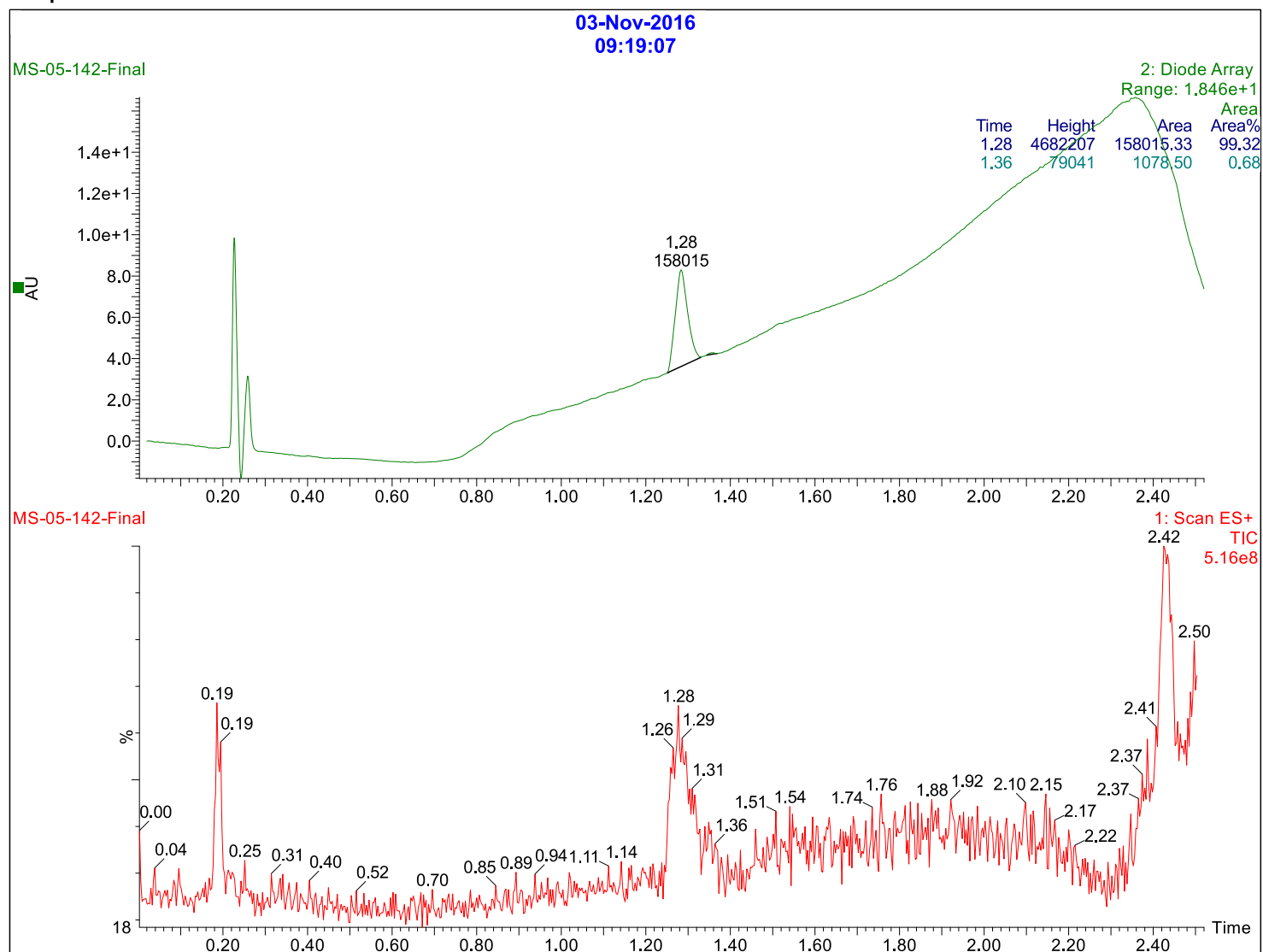
S16

Compound 2-L (linear analogue of 2)



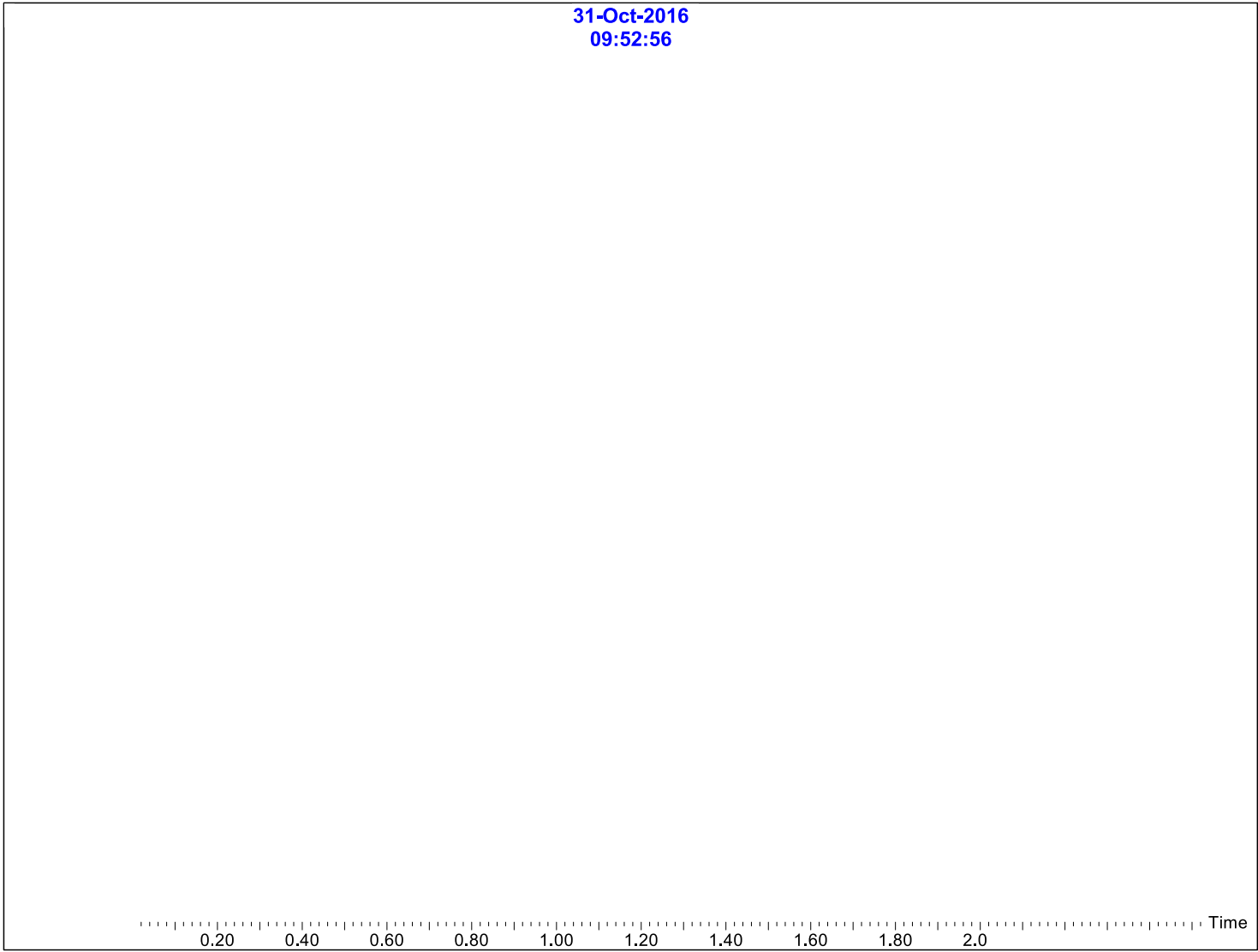
S17

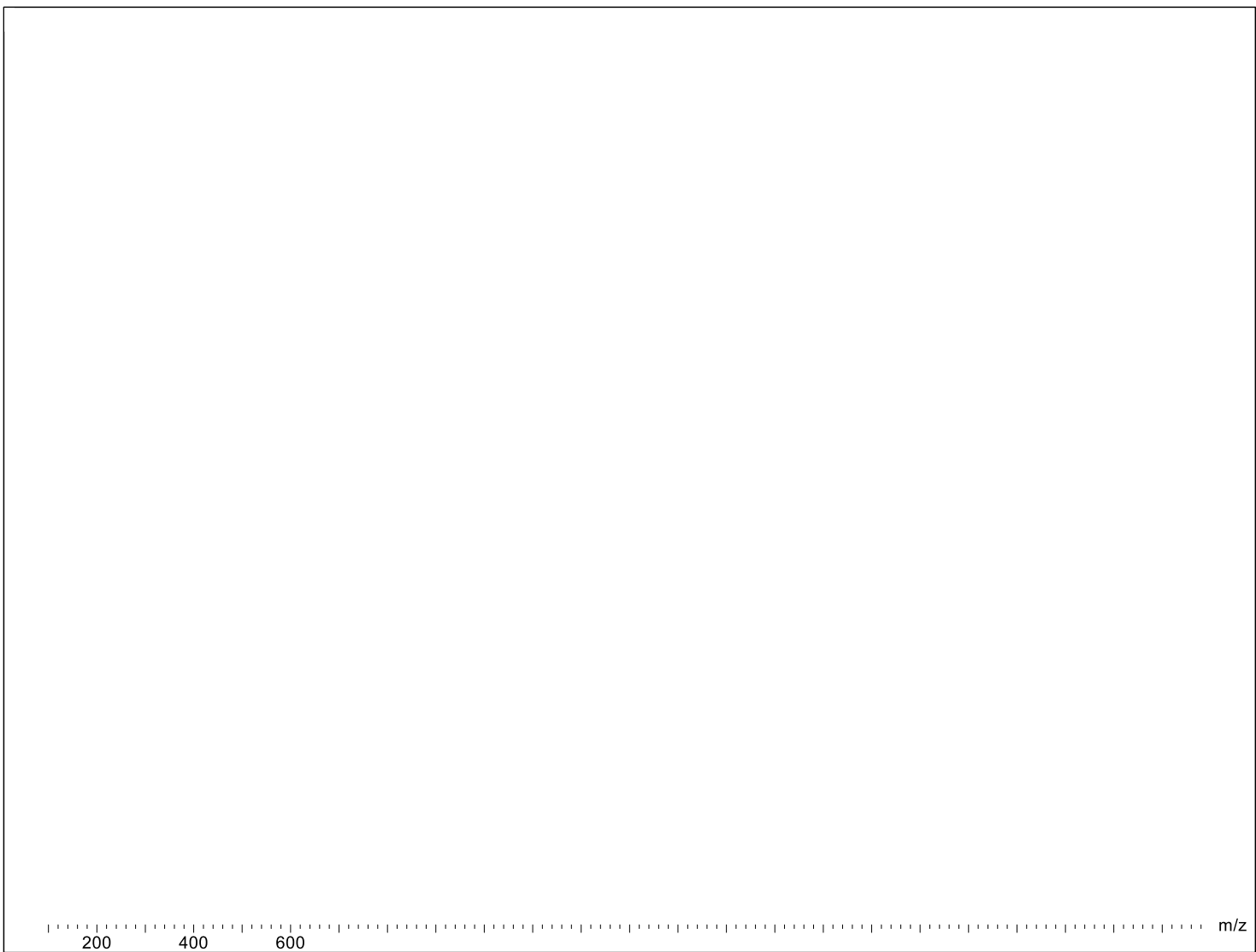
Compound 3

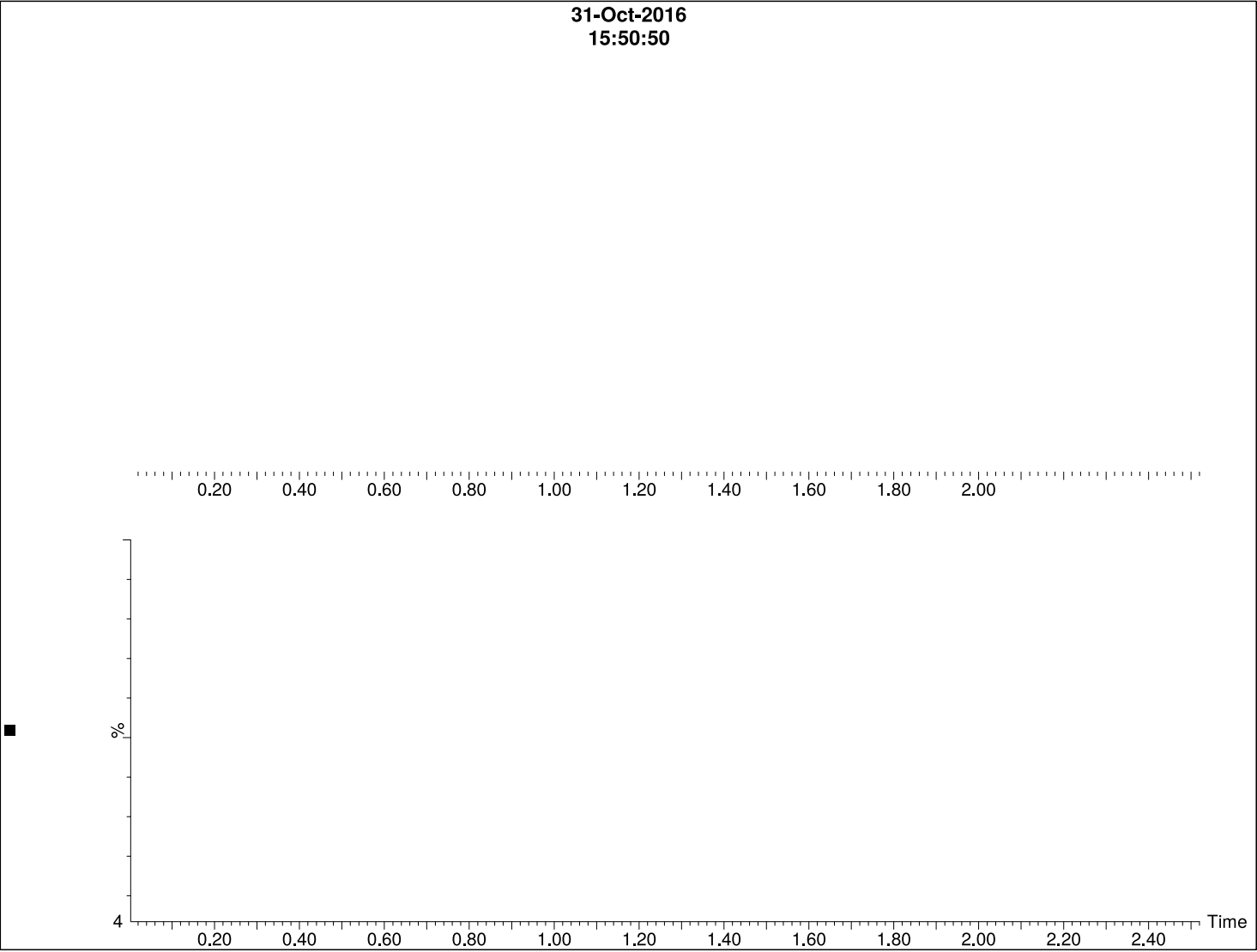


S18

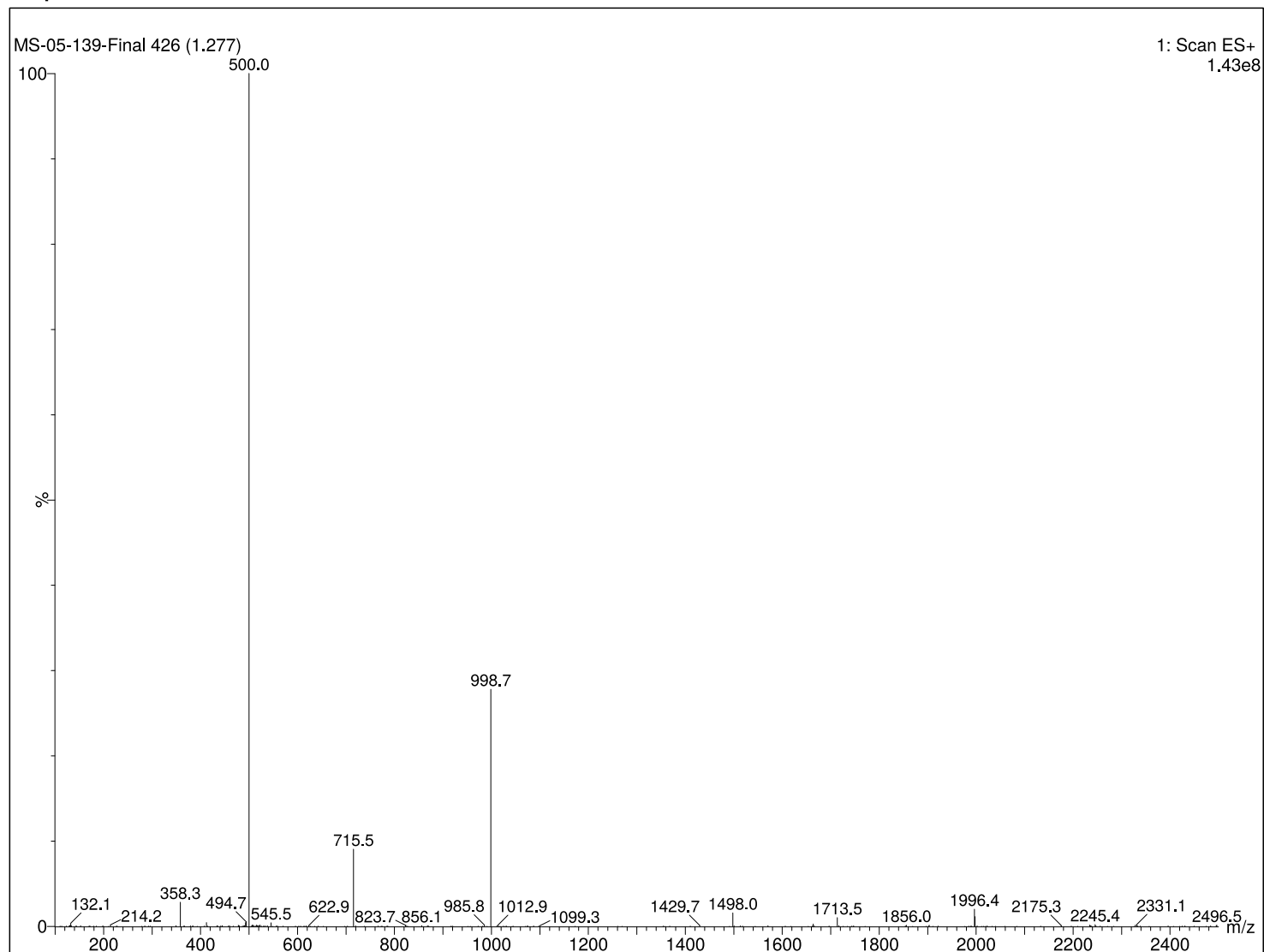








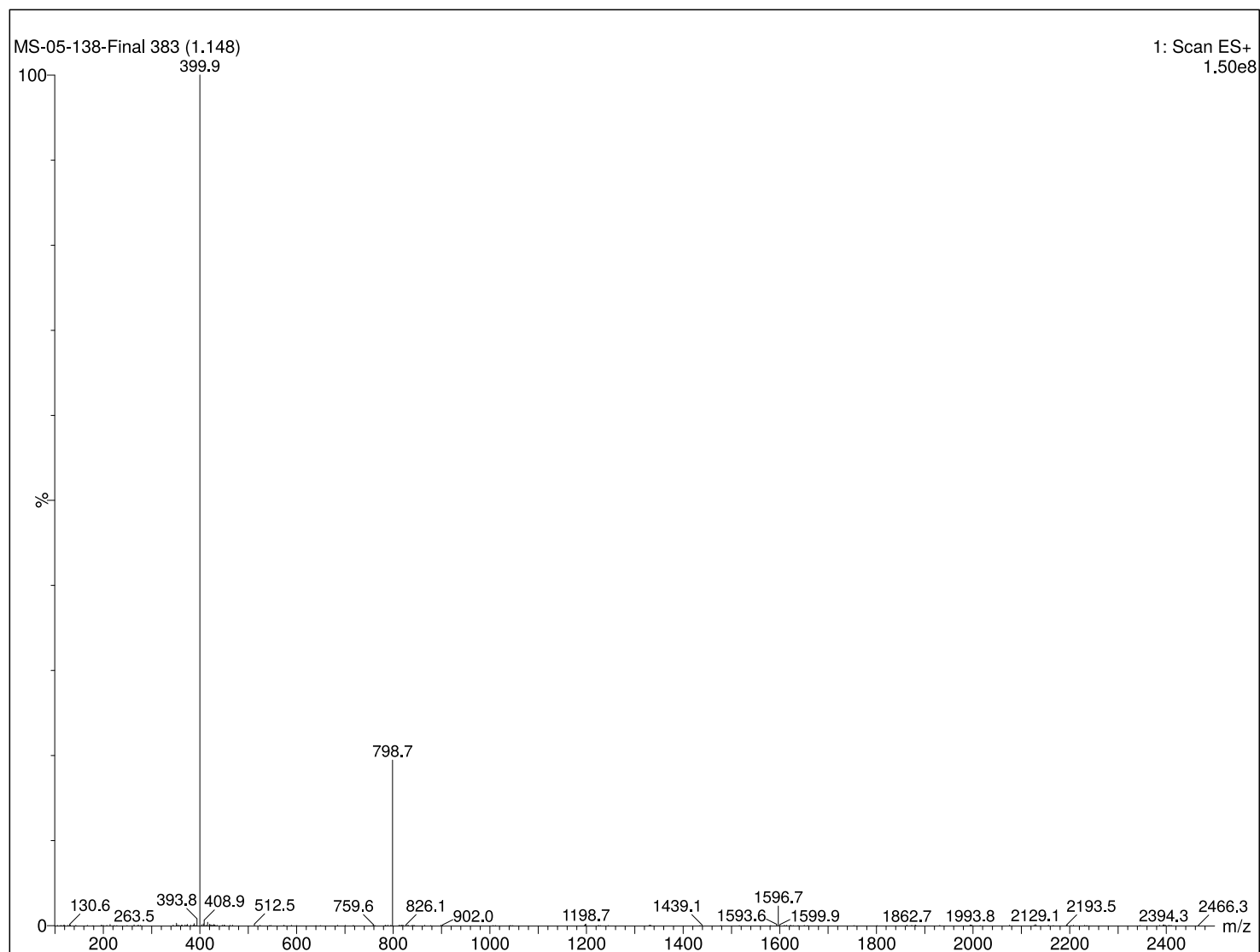
Compound 5



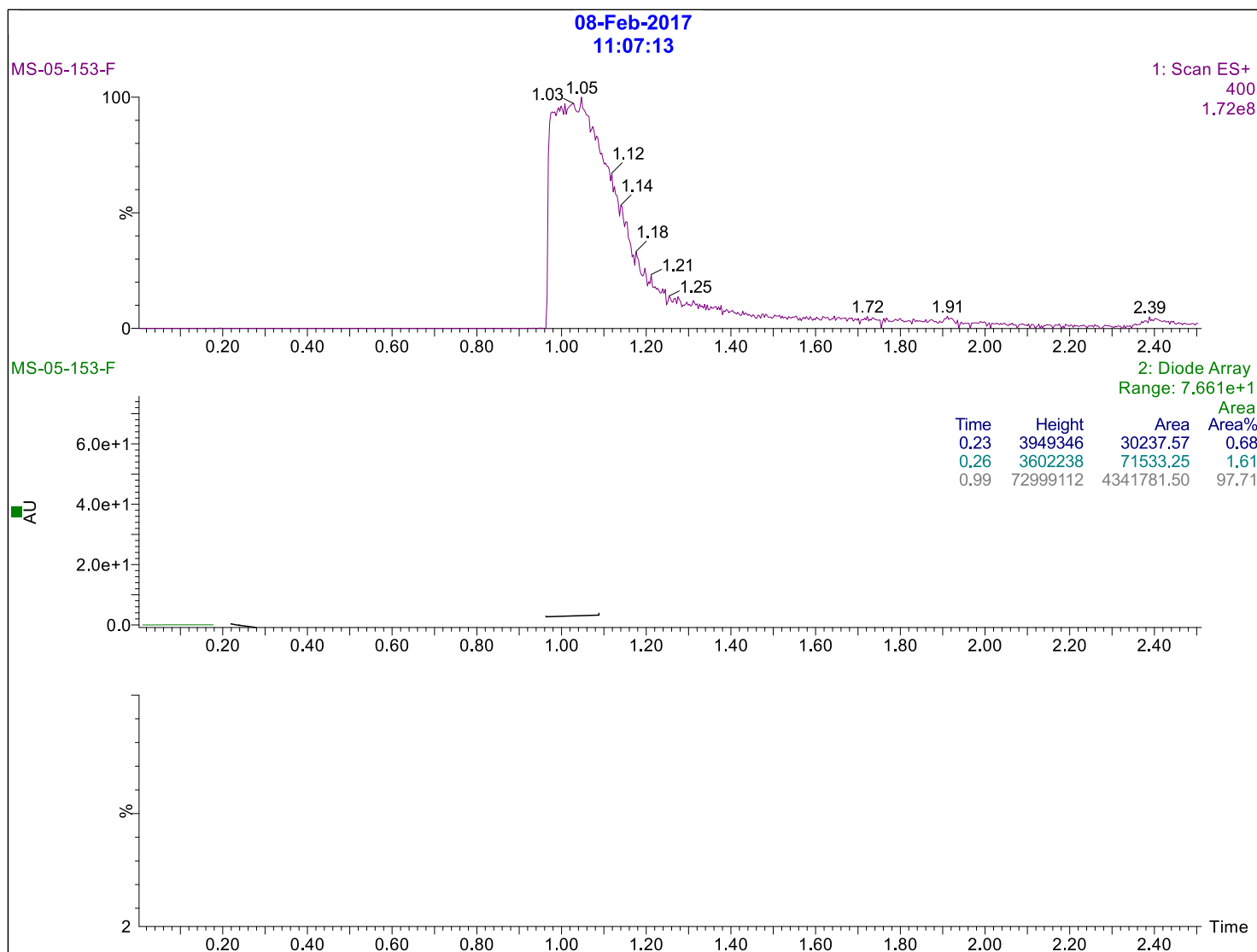
S23

15:47:2

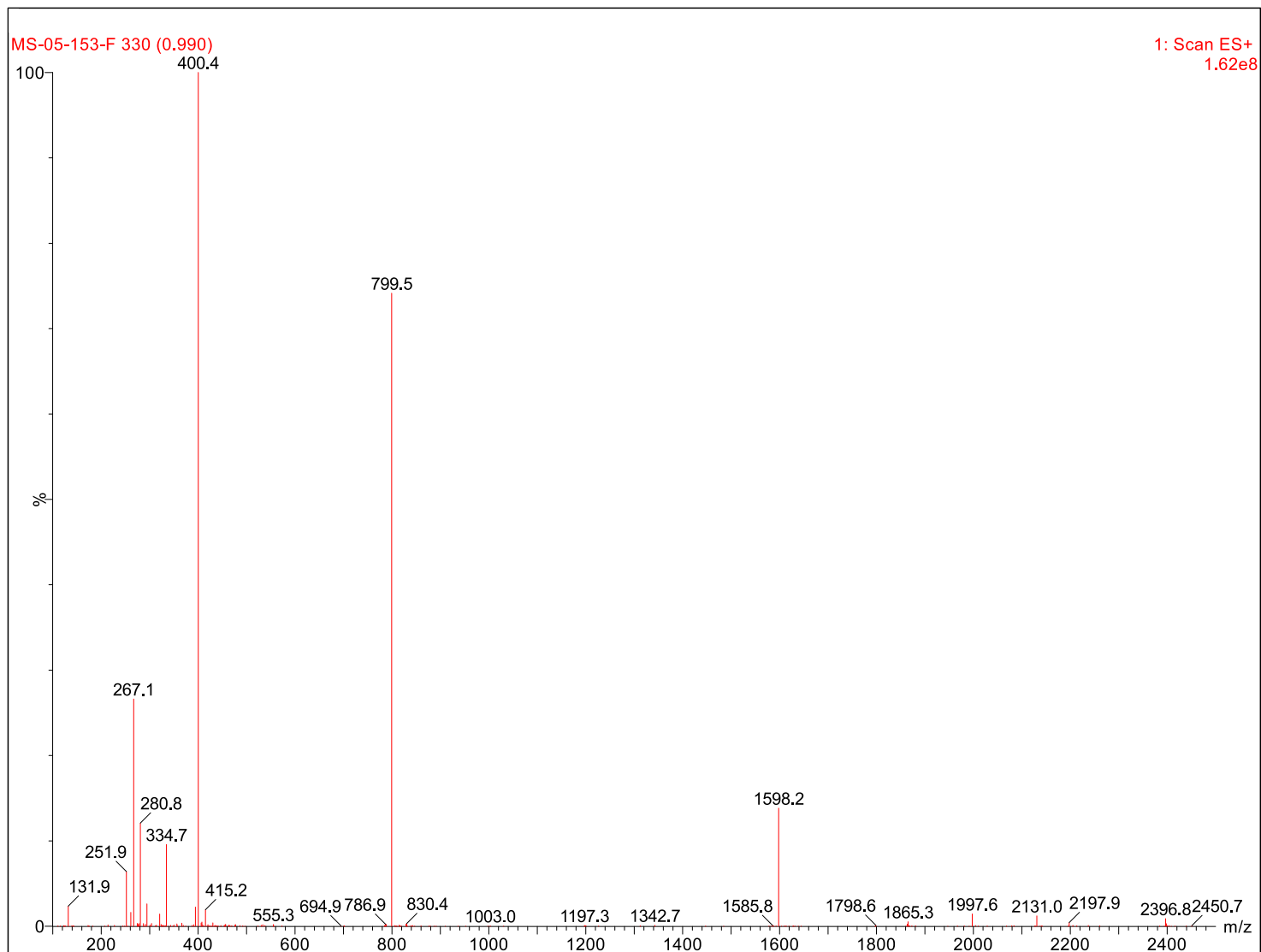
Compound 6



S25

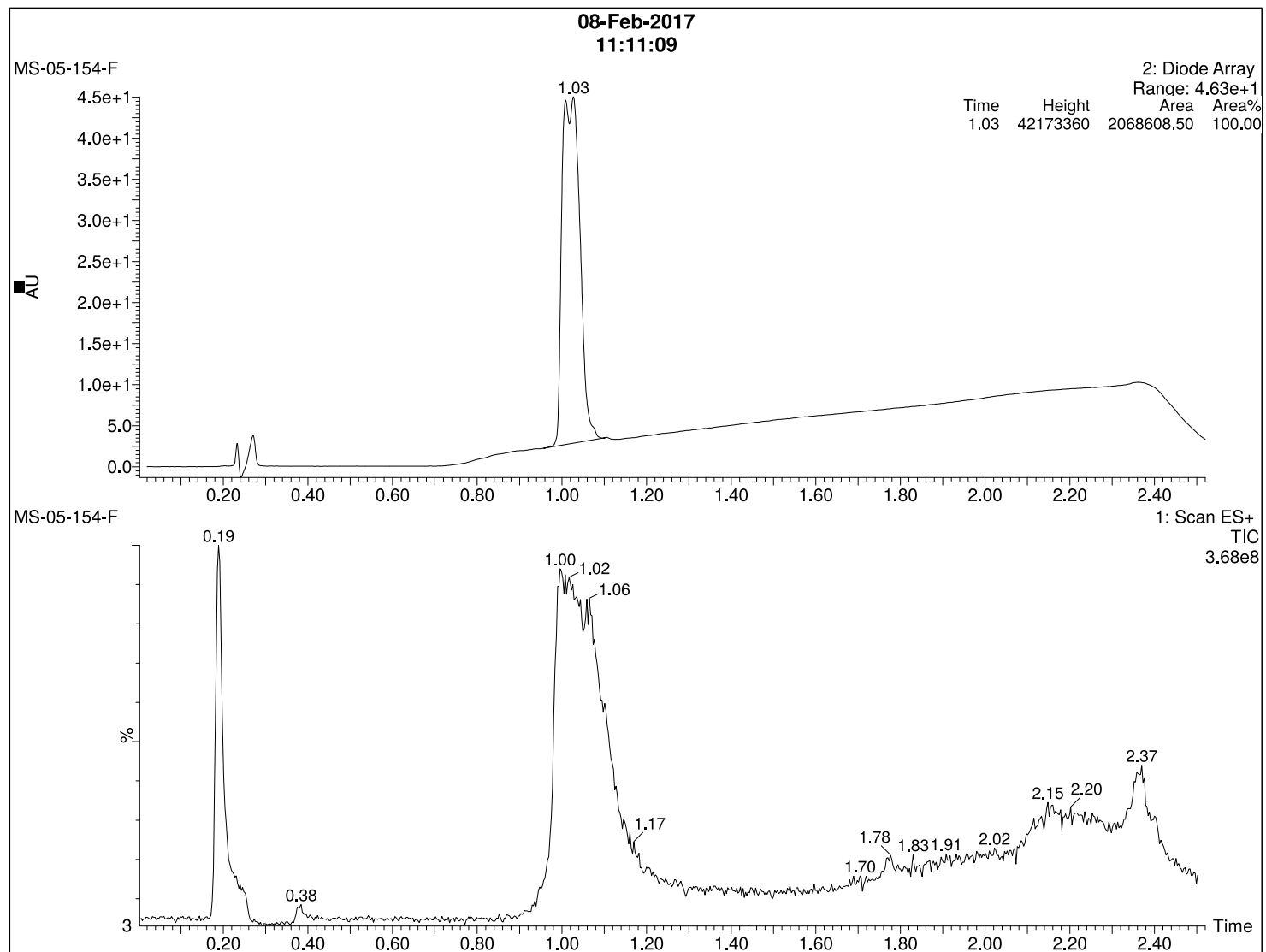


Compound 7



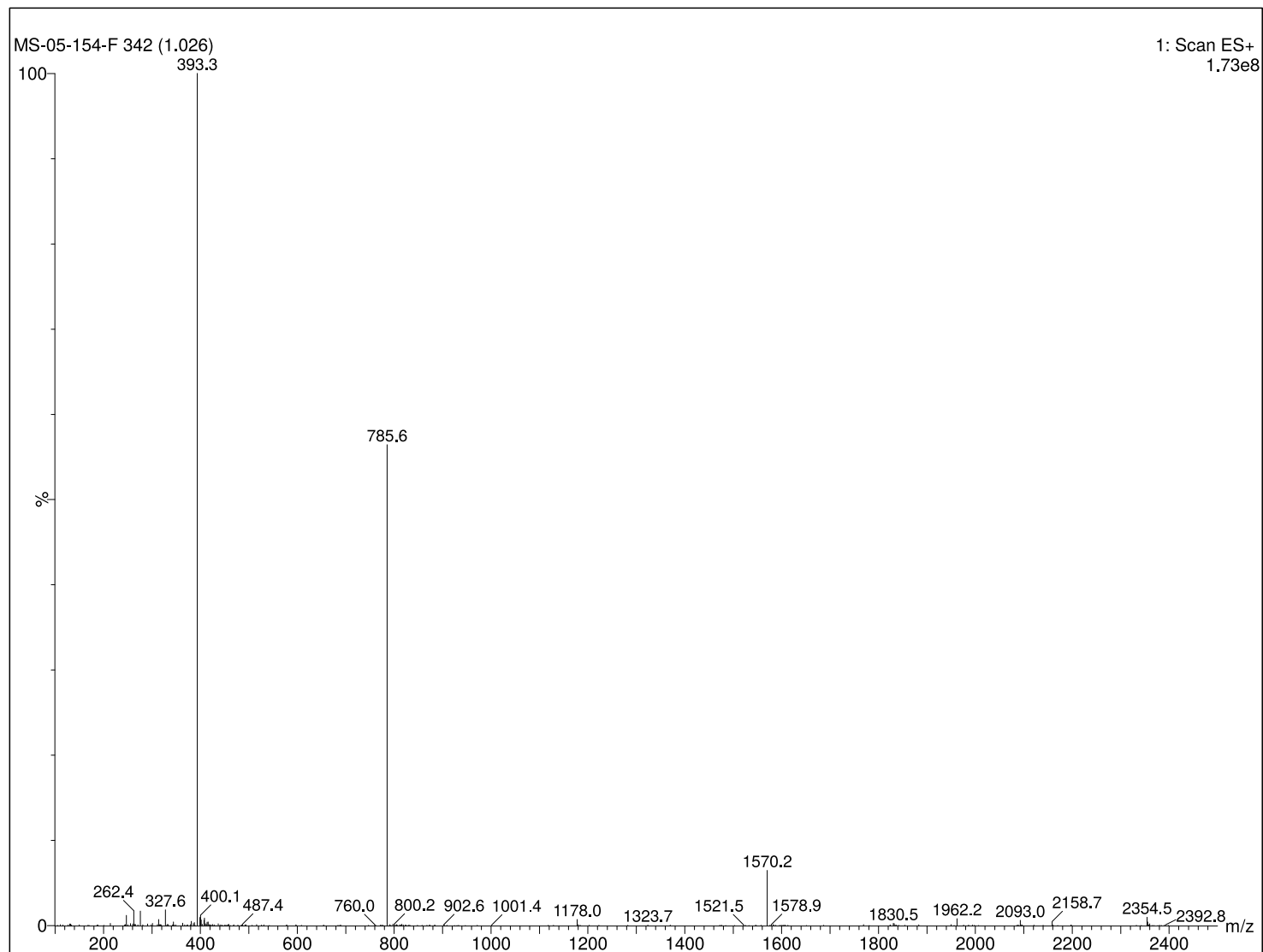
S27

Compound 8



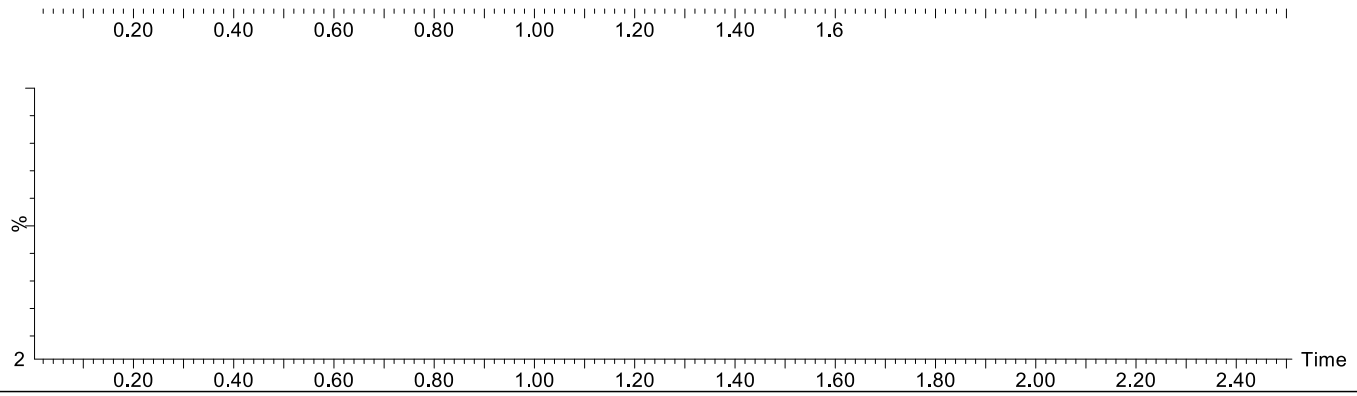
S28

Compound 8

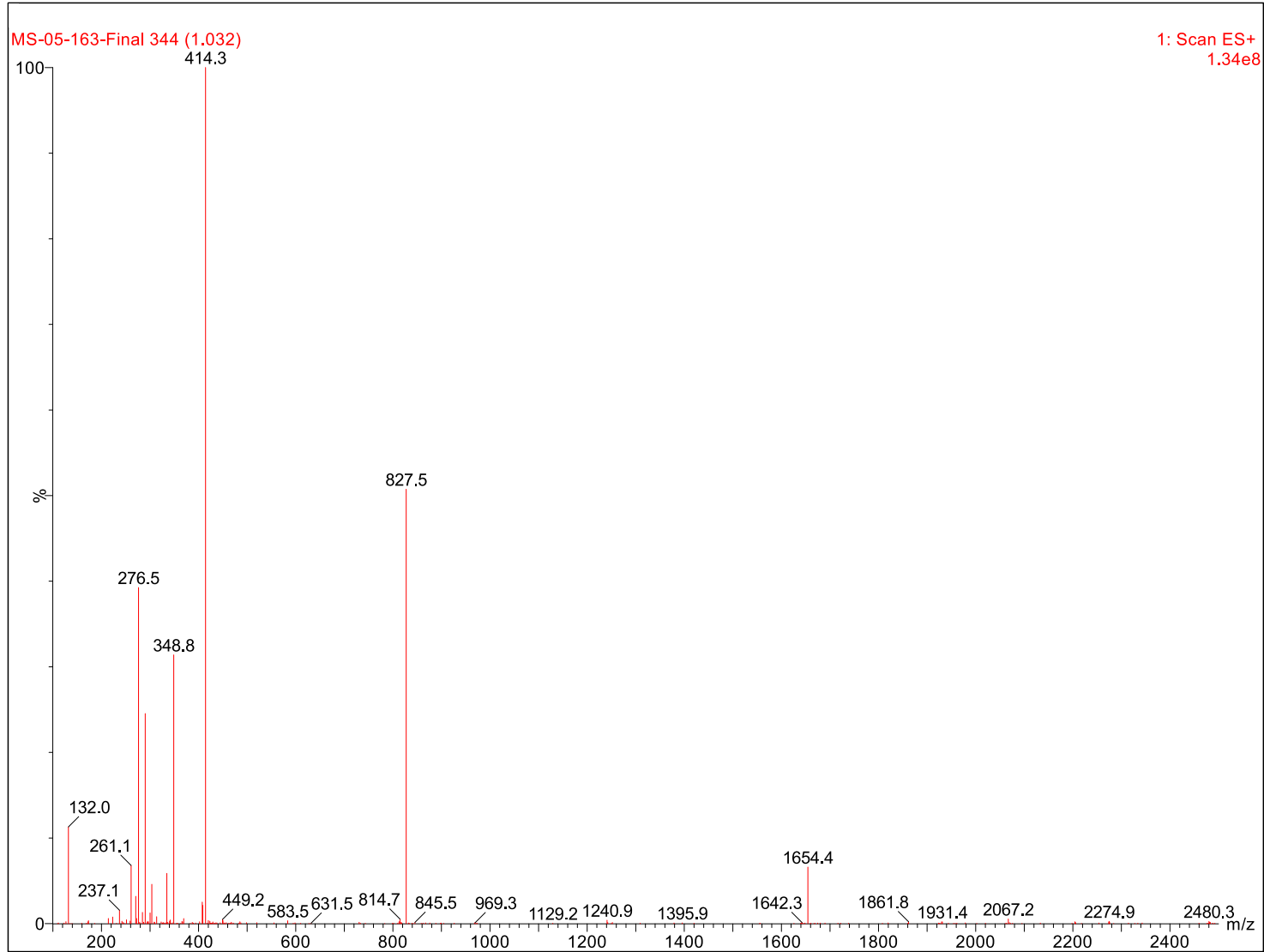


S29

16-Feb-2017
15:09:13

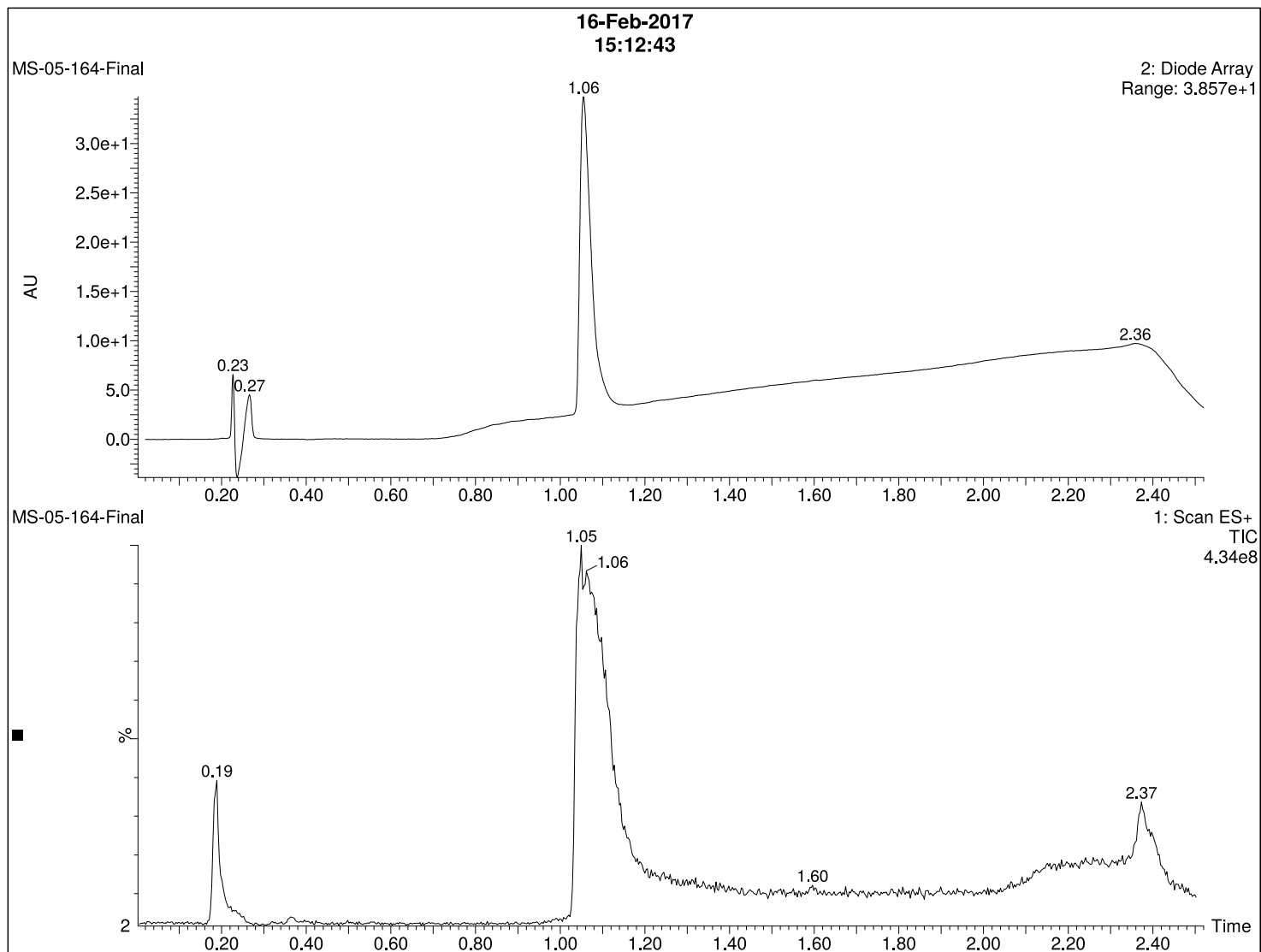


Compound 9



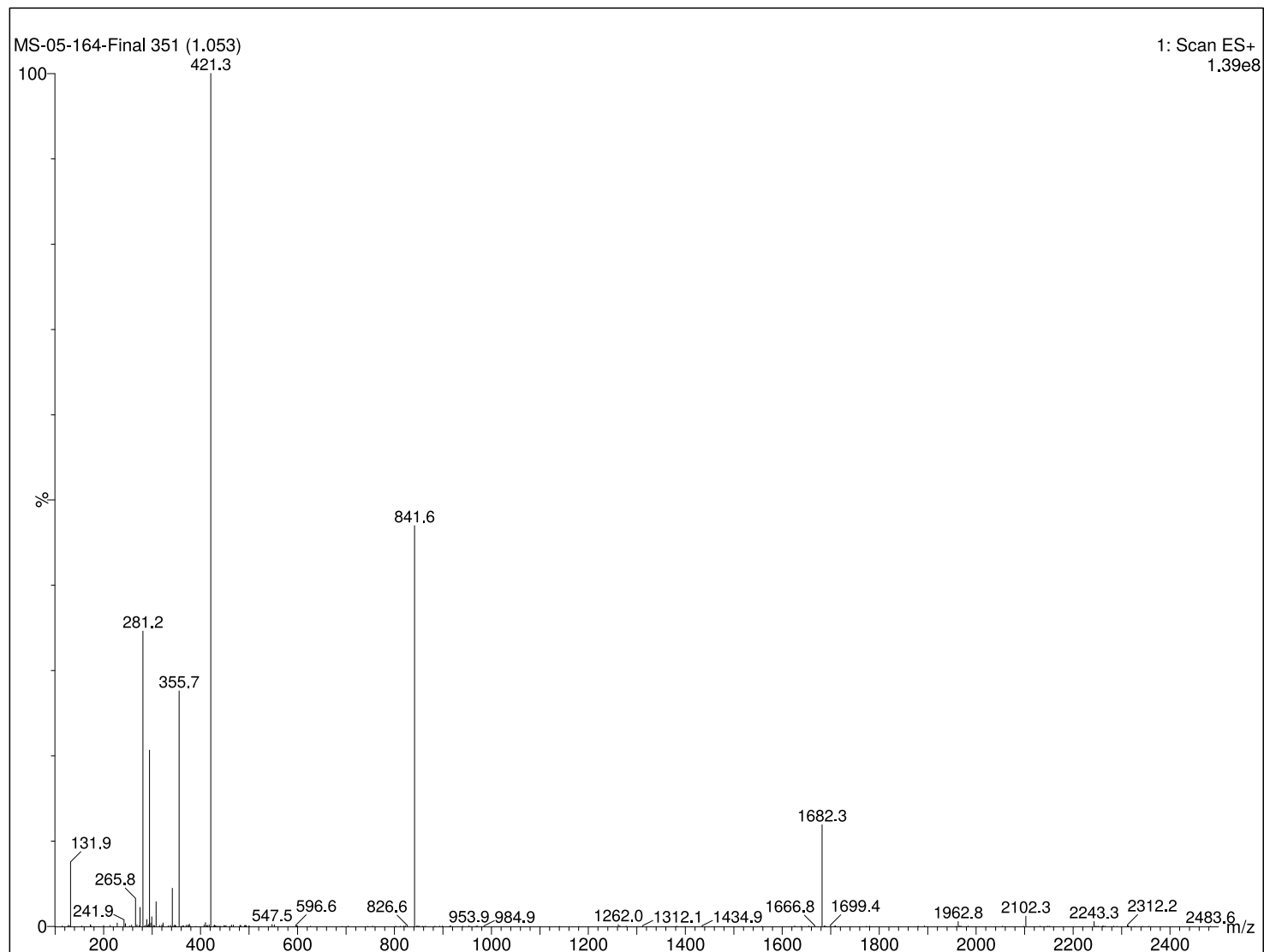
S31

Compound 10



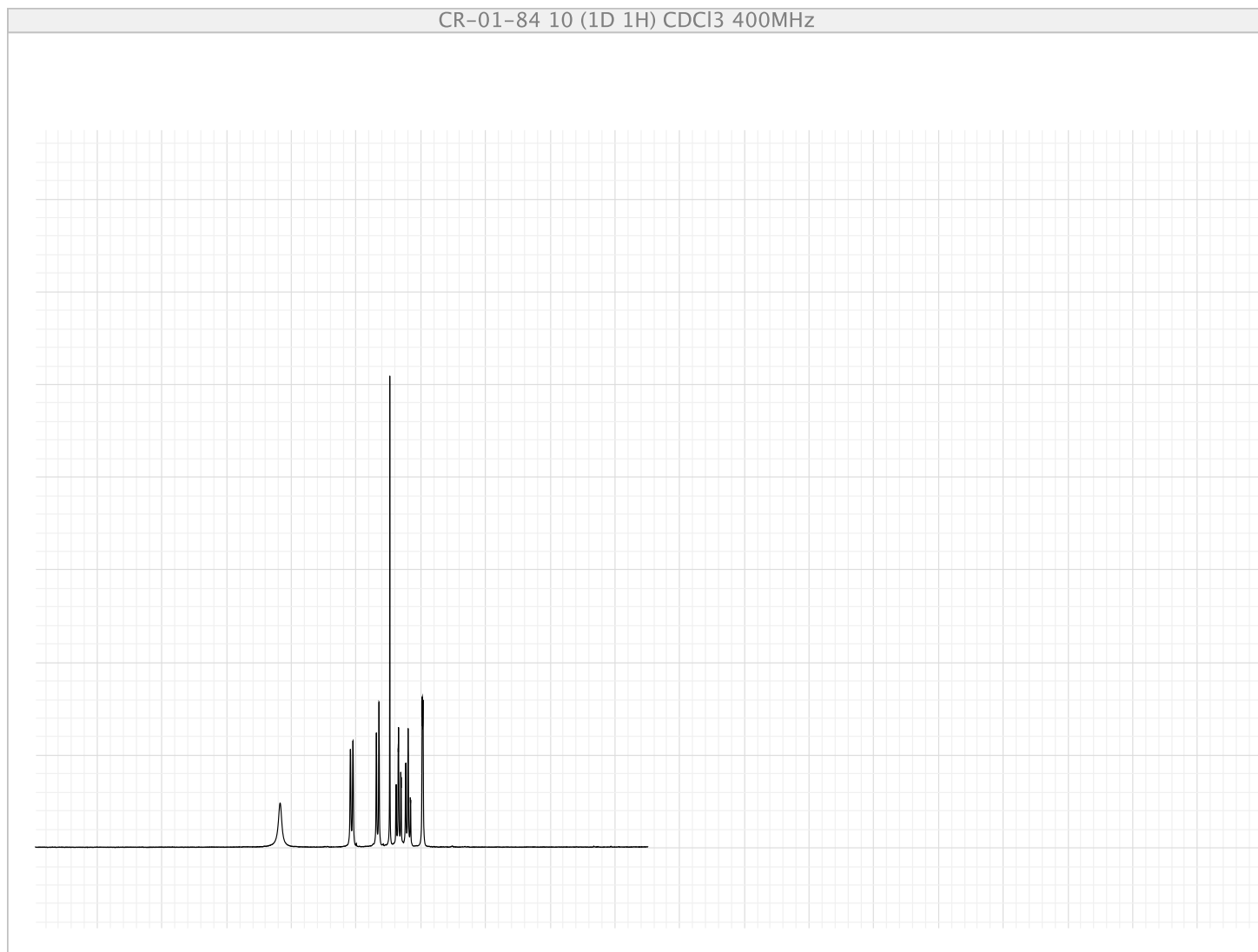
S32

Compound 10



S33

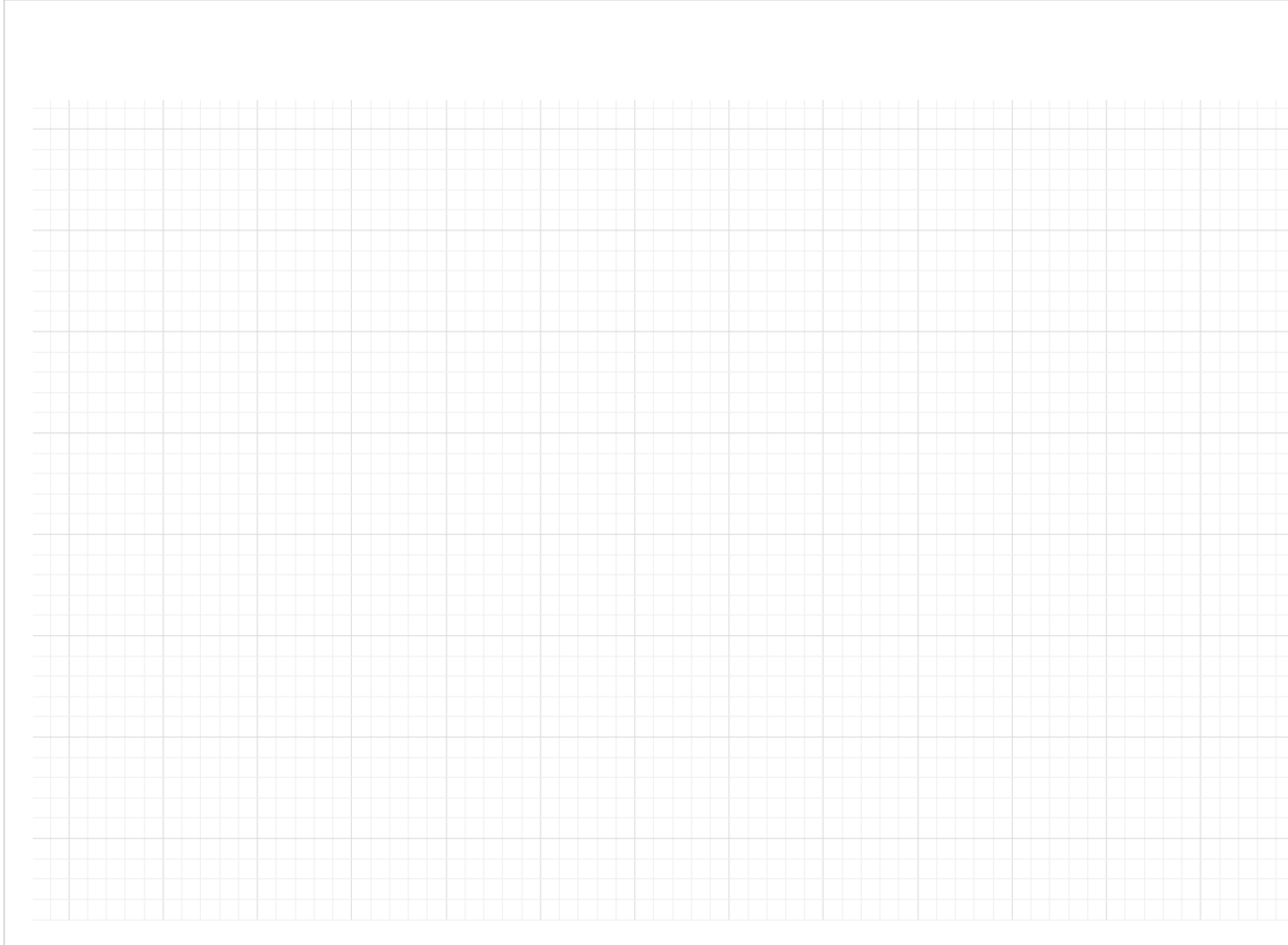
8.3 Annexe C : Caractérisation des composés du chapitre 5

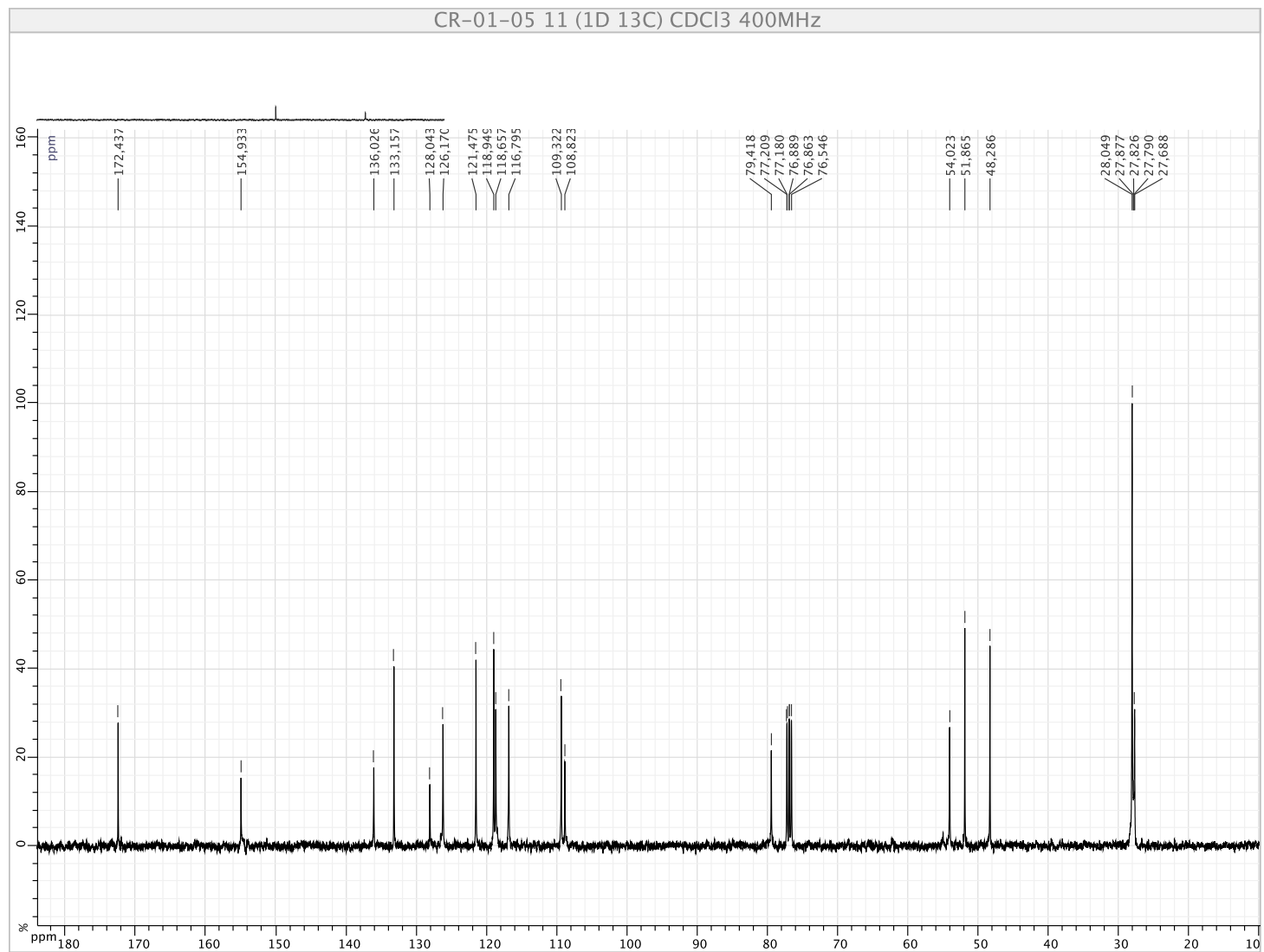


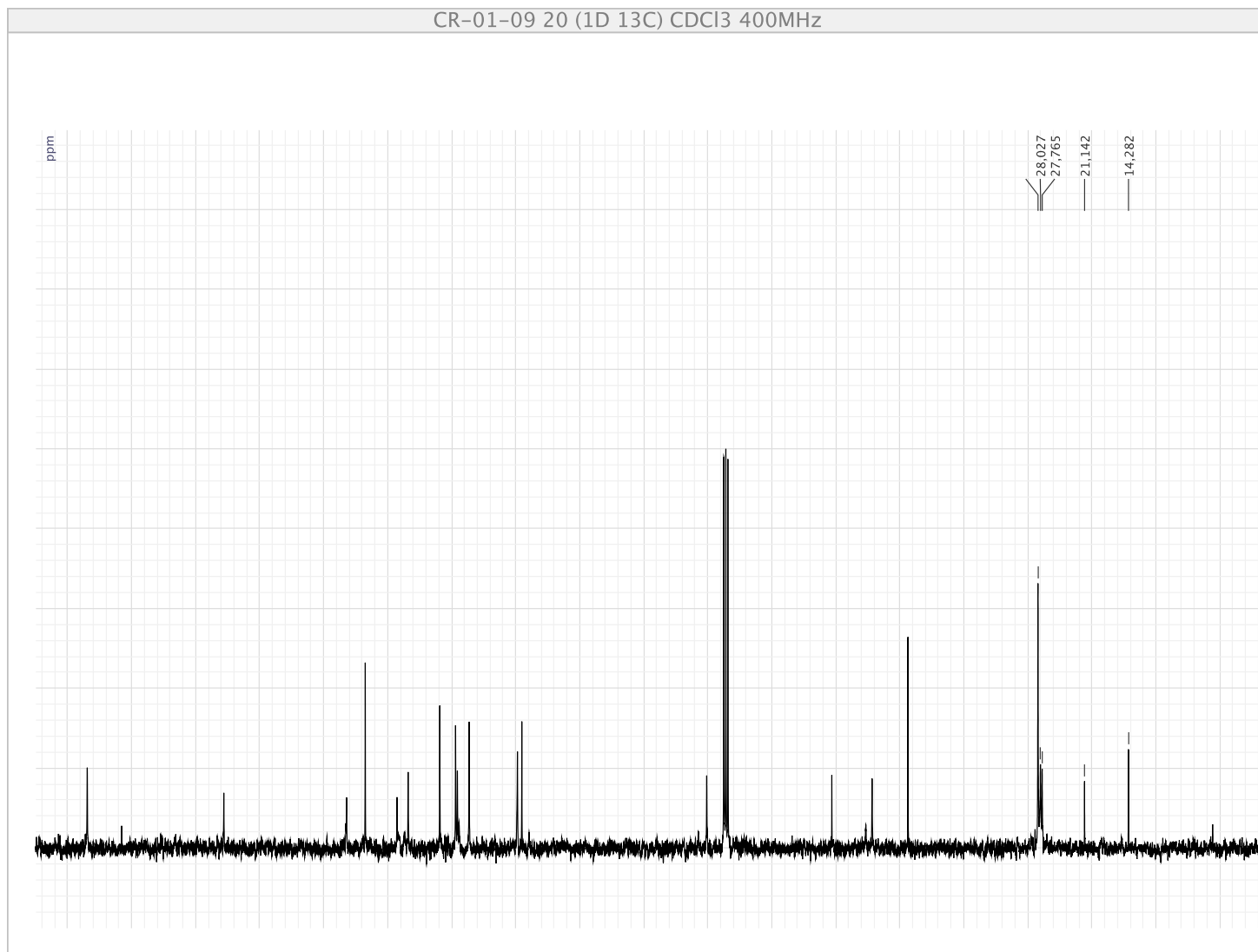
CR-01-03 15 (1D 13C) CDCl₃ 400MHz



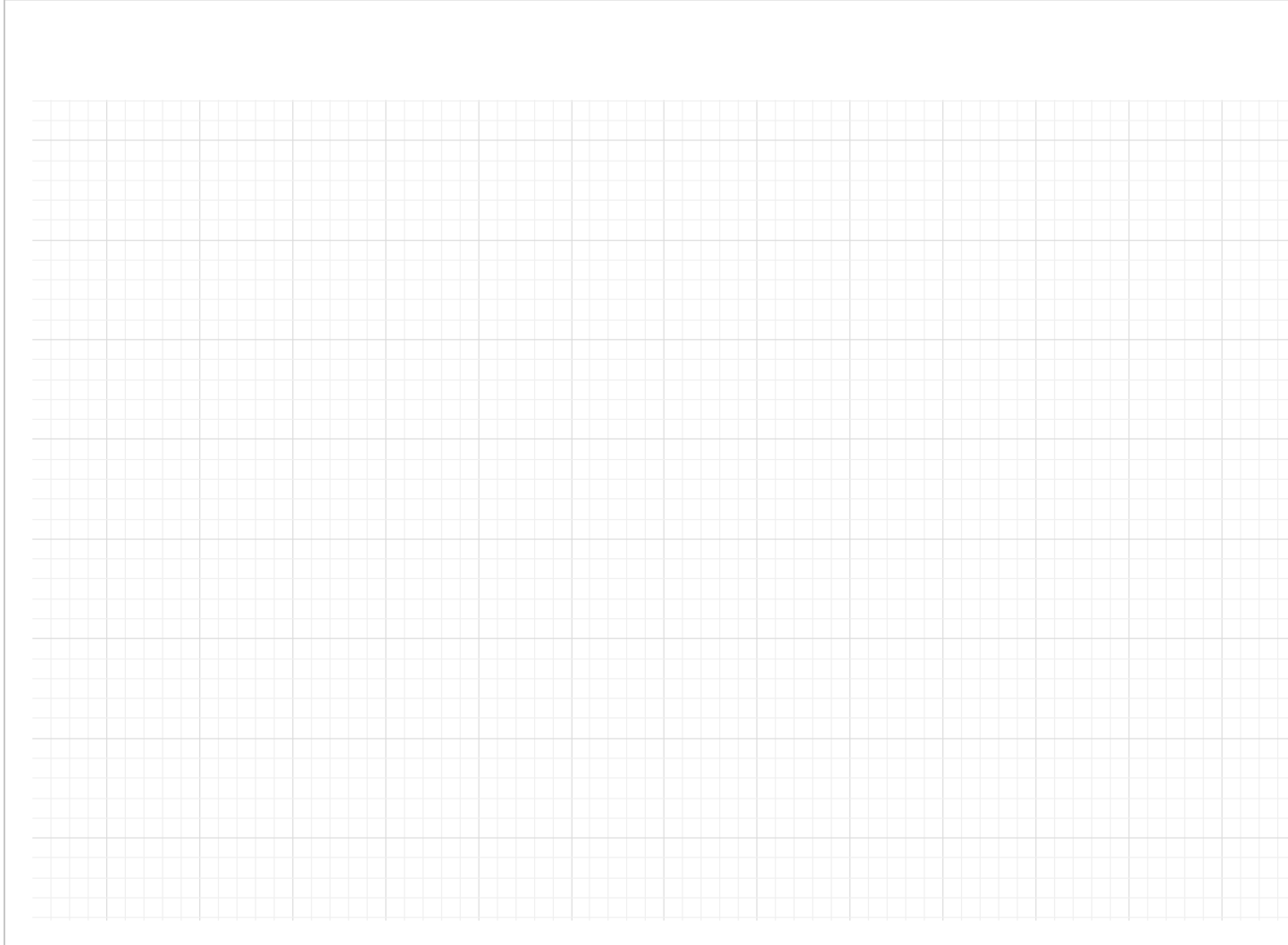
CR-01-85 10 (1D 1H) CDCl₃ 400MHz

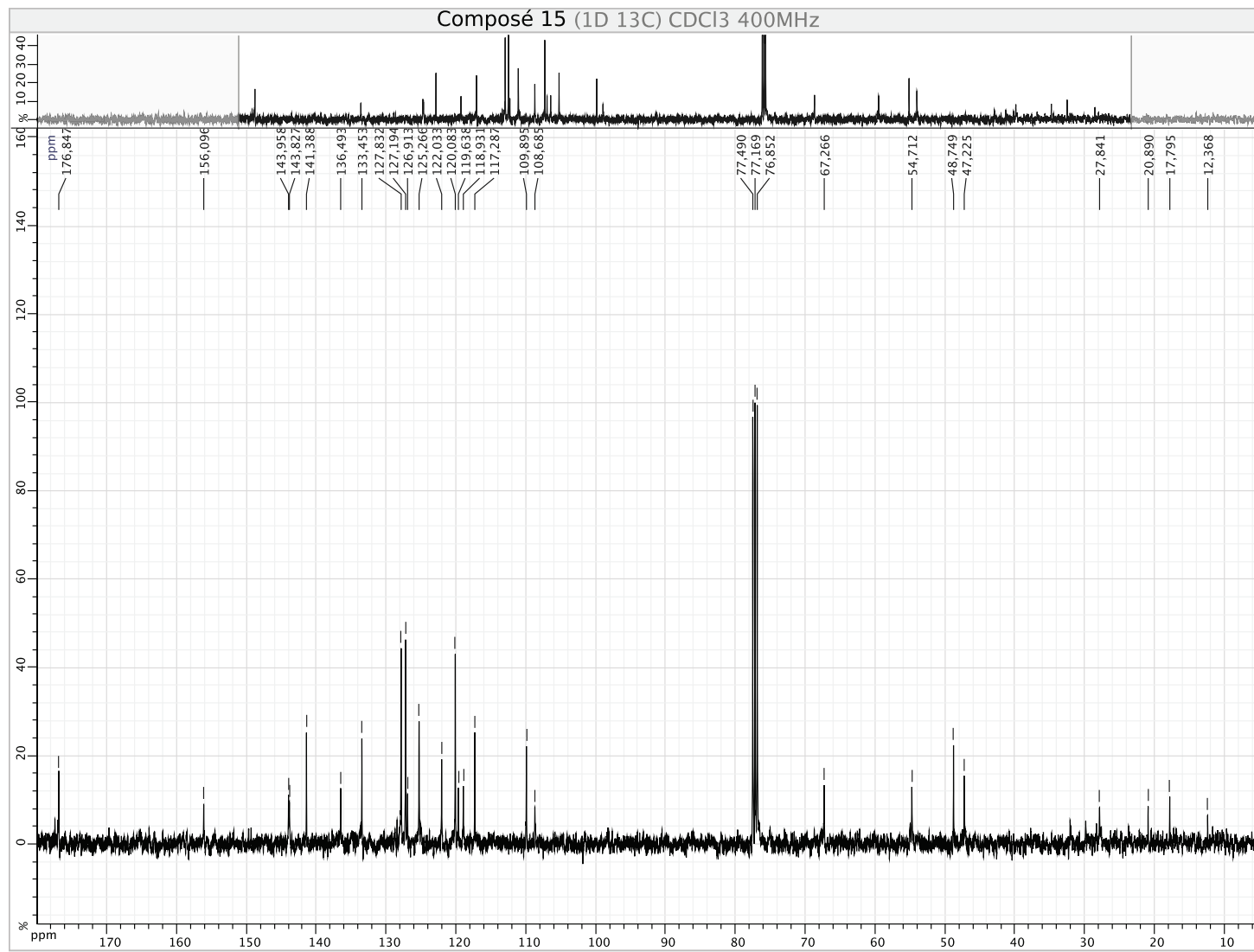




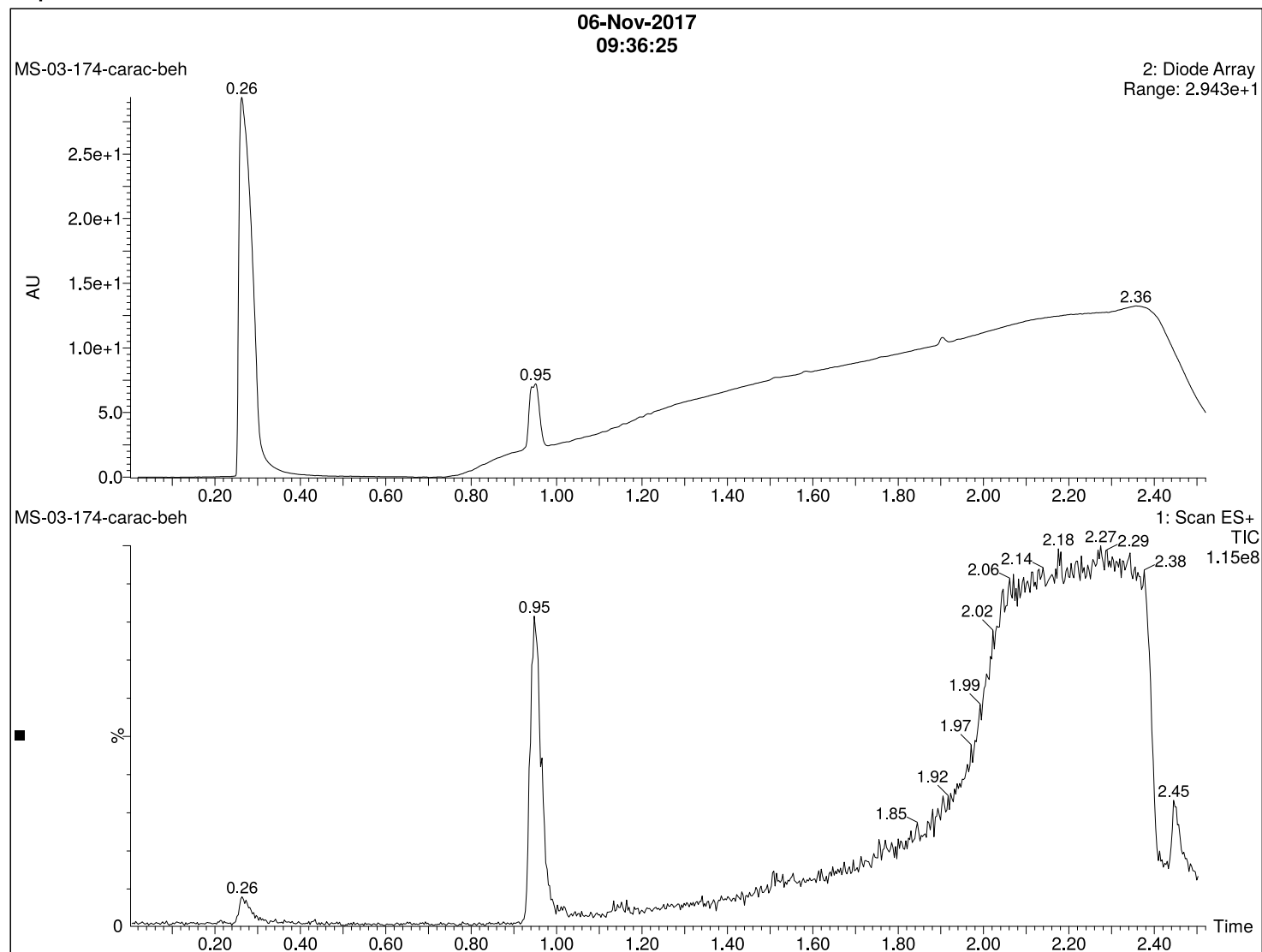


CR-01-25a 10 (1D 1H) CDCl₃ 400MHz

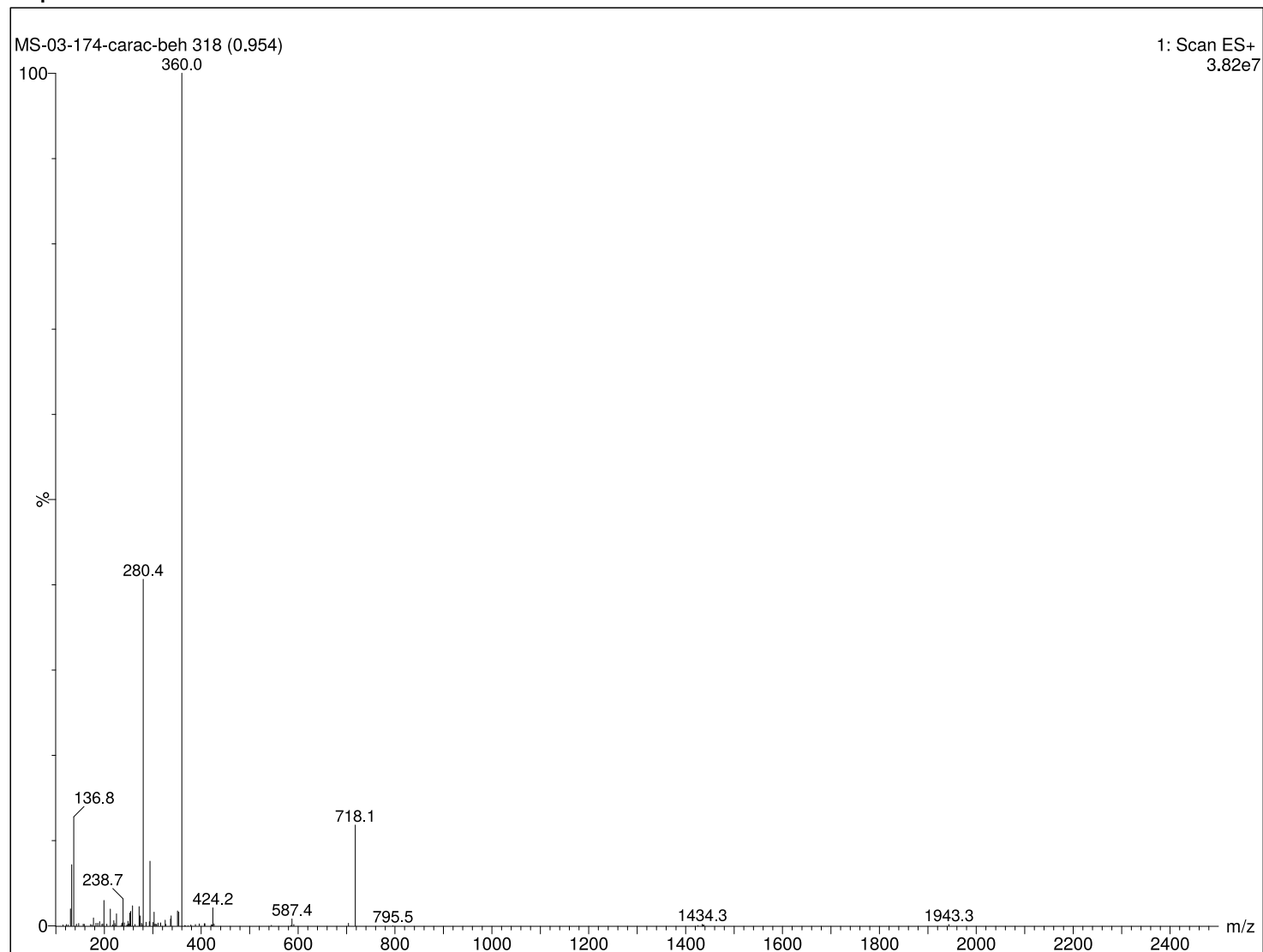




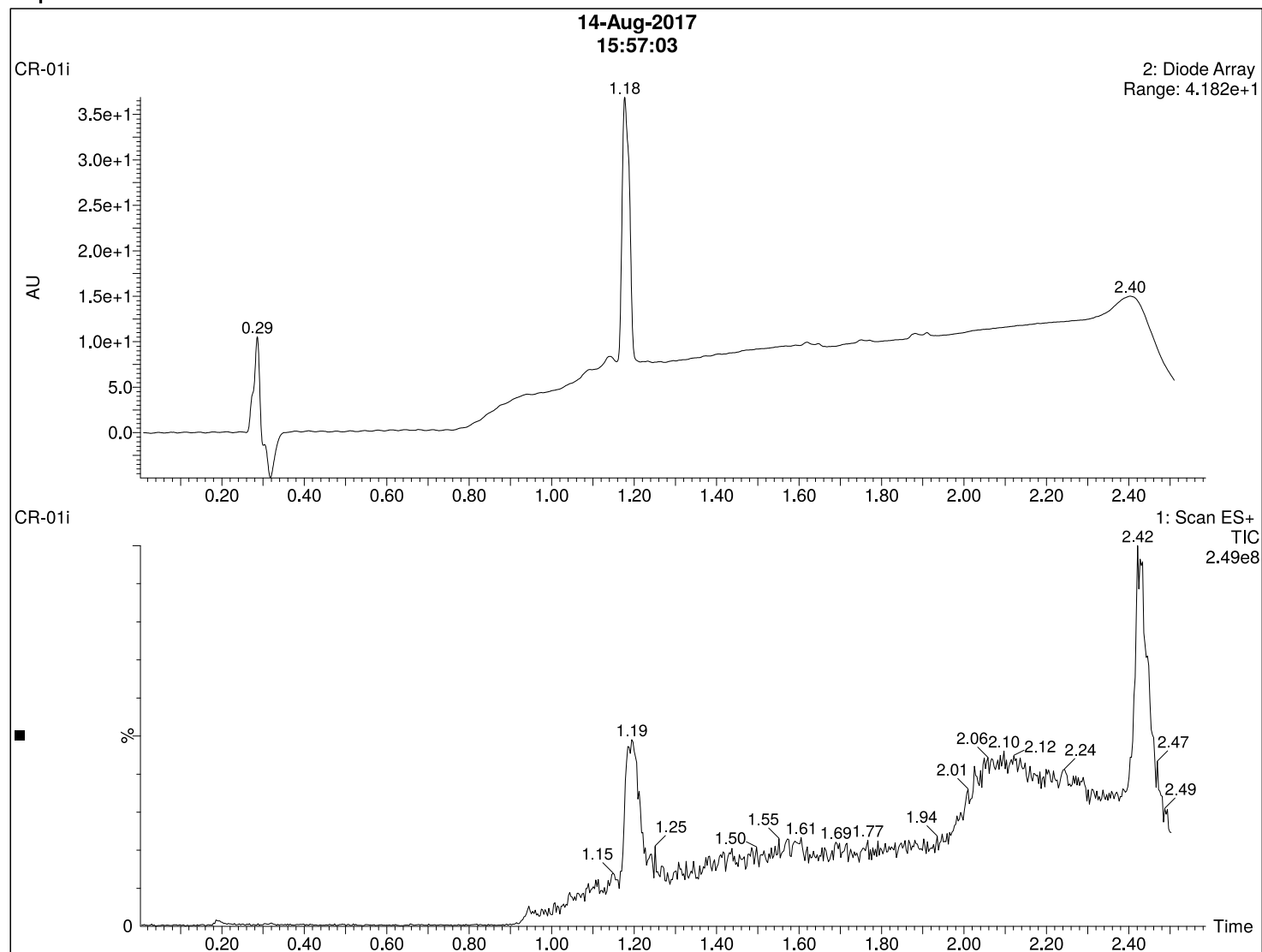
Composé 16 - UPLC



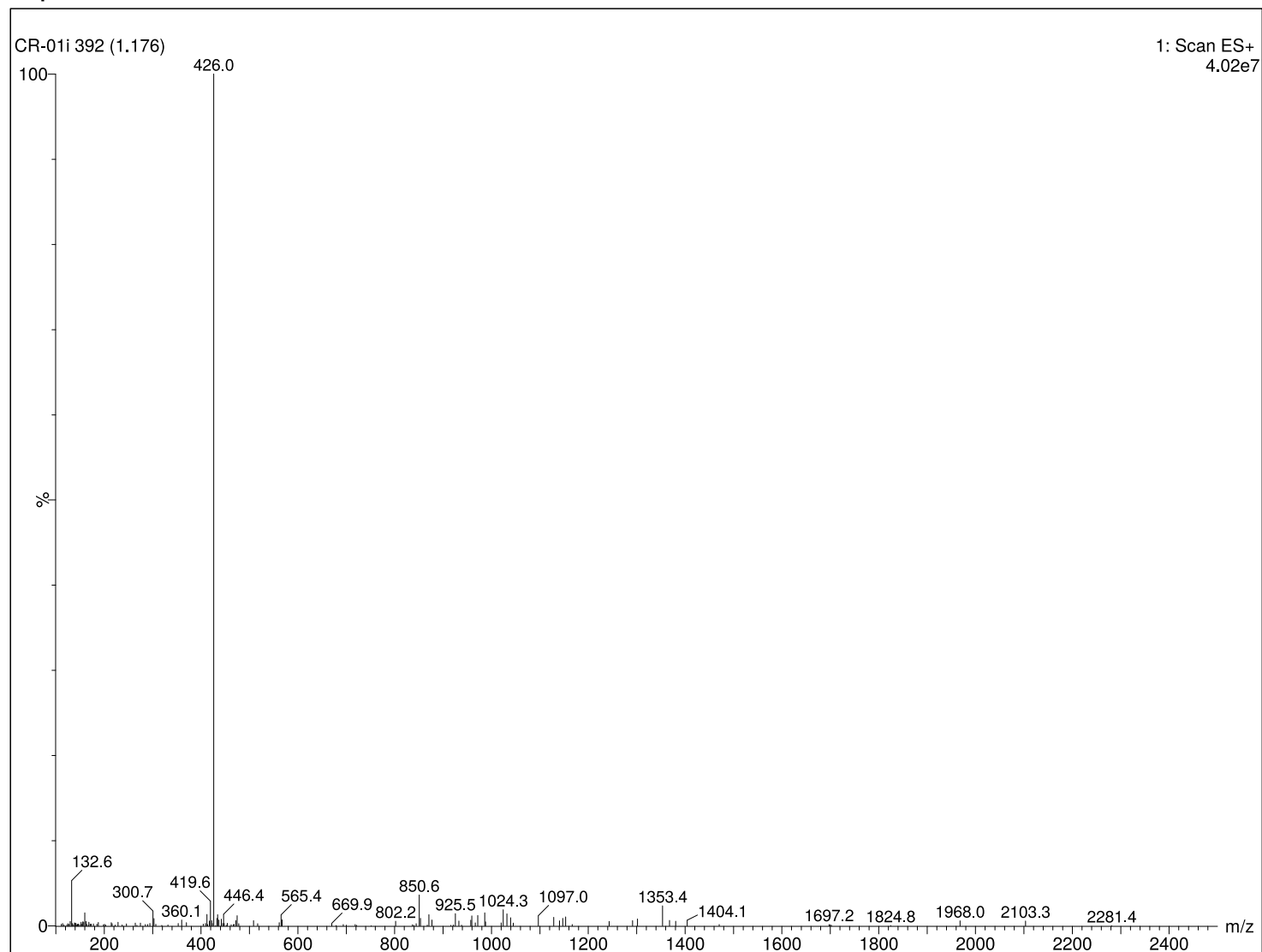
Composé 16 - Masse

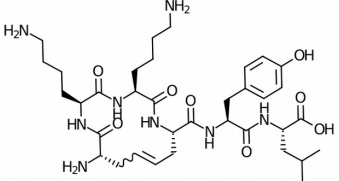
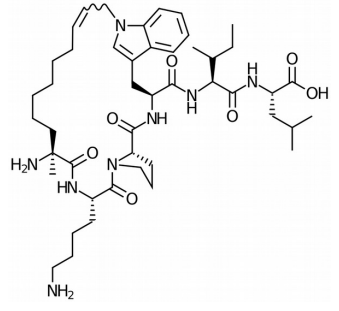


Composé 17 - UPLC



Composé 17 - Masse



Code	Structure	Obtenu (mg)	Formule moléculaire	Masse molaire (g/mol)	Pureté (%)	Masse exacte (calculée)	Masse exacte (observée)	Ion
16		4.8	$C_{35}H_{56}N_8O_8$	716.42	96	358.7185	358.7204	$[M+2H]^{2+}$
17		5.1	$C_{46}H_{72}N_8O_7$	849.11	92	849.5597	849.5618	$[M+H]^+$

BIBLIOGRAPHIE

- Akunne, H. C., Darling, S., Zoski, K., Seffler, a. M., He, J. X., Sawyer, T. K., Pugsley, T. a., et Cody, W. L. (1996) Functional activity of new C-terminal cyclic-neurotensin fragment analogs. *Neuropeptides*, 30(3) : 213–8.
- Allen, S. J., Crown, S. E., et Handel, T. M. (2007) Chemokine : Receptor structure, interactions and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.*, 25 : 787–820.
- Archer, S. et Harris, L. S. (1965) Narcotic antagonists. *Fortschr. Arzneimittelforsch.*, 8 : 261–320.
- Audet, M. et Bouvier, M. (2012) Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell*, 151(1) : 14–23.
- Ballesteros, J. A. et Weinstein, H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.*, 25(C) : 366–428.
- Barbero, P., Rovère, C., De Bie, I., Seidah, N., Beaudet, A., et Kitabgi, P. (1998) PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 273(39) : 25339–25346.
- Barroso, S., Richard, F., Nicolas-Ethève, D., Reversat, J. L., Bernassau, J. M., Kitabgi, P., et Labbé-Jullié, C. (2000) Identification of residues involved in neurotensin binding and modeling of the agonist binding site in neurotensin receptor 1. *J. Biol. Chem.*, 275(1) : 328–36.
- Basbaum, A. I. et Fields, H. L. (1978) Endogenous pain control mechanisms : review and hypothesis. *Ann. Neurol.*, 4(5) : 451–62.
- Beck, J. G., Chatterjee, J., Laufer, B., Kiran, M. U., Frank, A. O., Neubauer, S., Ovadia, O., Greenberg, S., Gilon, C., Hoffman, A., et Kessler, H. (2012) Intestinal permeability of cyclic peptides : common key backbone motifs identified. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(29) : 12125–33.
- Behbehani, M. M. et Pert, a. (1984) A mechanism for the analgesic effect of neurotensin as revealed by behavioral and electrophysiological techniques. *Brain Res.*, 324(1) : 35–42.
- Besserer-Offroy, É., Brouillette, R. L., Lavenus, S., Froehlich, U., Brumwell, A., Murza, A., Longpré, J.-M., Marsault, É., Grandbois, M., Sarret, P., et Leduc, R. (2017) The signaling signature of the neurotensin type 1 receptor with endogenous ligands. *Eur. J. Pharmacol.*, 805(January) : 1–13.

- Bittermann, H., Einsiedel, J., Hübner, H., et Gmeiner, P. (2004) Evaluation of lactam-bridged neurotensin analogues adjusting ψ (Pro10) close to the experimentally derived bioactive conformation of NT(8-13). *J. Med. Chem.*, 47(22) : 5587–90.
- Blackwell, H. E. et Grubbs, R. H. (1998) Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis. *Angew. Chemie Int. Ed.*, 37(23) : 3281–3284.
- Blackwell, H. E., Sadowsky, J. D., Howard, R. J., Sampson, J. N., Chao, J. A., Steinmetz, W. E., O'Leary, D. J., et Grubbs, R. H. (2001) Ring-closing metathesis of olefinic peptides : Design, synthesis, and structural characterization of macrocyclic helical peptides. *J. Org. Chem.*, 66(16) : 5291–5302.
- Bodnar, R. J. (2013) Endogenous Opiates and Behavior : 2012. *Peptides*, pages 1–41.
- Bondensgaard, K., Ankersen, M., Thøgersen, H., Hansen, B. S., Wulff, B. S., et Bywater, R. P. (2004) Recognition of privileged structures by G-protein coupled receptors. *J. Med. Chem.*, 47(4) : 888–99.
- Bredeloux, P., Cavelier, F., Dubuc, I., Vivet, B., Costentin, J., et Martinez, J. (2008) Synthesis and biological effects of c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (JMV2012), a new analogue of neurotensin that crosses the blood-brain barrier. *J. Med. Chem.*, 51(6) : 1610–6.
- Brik, A. (2008) Metathesis in Peptides and Peptidomimetics. *Adv. Synth. Catal.*, 350(11-12) : 1661–1675.
- Bylund, D. B. et Toews, M. L. (1993) Radioligand binding methods : practical guide and tips. *Am. J. Physiol.*, 265(5 Pt 1) : L421–9.
- Cardote, T. A. et Ciulli, A. (2016) Cyclic and Macrocyclic Peptides as Chemical Tools to Recognise Protein Surfaces and Probe Protein-Protein Interactions. *ChemMedChem*, 11(8) : 787–794.
- Carraway, R. et Leeman, S. E. (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.*, 248(19) : 6854–61.
- Carraway, R. E., Mitra, S. P., et Spaulding, G. (1992) Posttranslational processing of the neurotensin/neuromedin-N precursor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 668 : 1–16.
- Case, D., Darden, T., Cheatham, T. I., Simmerling, C., Wang, J., Duke, R., Luo, R., Walker, R., Zhang, W., Merz, K., Roberts, M., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Götz, A., Kolossváry, I., Wong, K., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R., Liu, J., Wu, X., Brozell, S., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe, D., Mathews, D., Seetin, M., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, S., Gusarov, S., Kovalenko, A., et Kollman, P. (2012) Amber12.
- Cavelier, F., Vivet, B., Martinez, J., Aubry, A., Didierjean, C., Vicherat, A., et Marraud, M. (2002) Influence of silaproline on peptide conformation and bioactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(12) : 2917–2923.

- Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., Le Fur, G., Ferrara, P., et Caput, D. (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett.*, 386(2-3) : 91–4.
- Charfi, I., Audet, N., Bagheri Tudashki, H., et Pineyro, G. (2014) Identifying ligand-specific signalling within biased responses : focus on delta opioid receptor ligands. *Br. J. Pharmacol.*
- Chatenet, D. et Hébert, T. E. (2017) Understanding GPCR signaling in the brain- the path to CNS drug discovery. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 32 : v–vii.
- Chauvin, Y. (2006) Olefin metathesis : The early days (nobel lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 45(23) : 3741–3747.
- ChemCompGroup (2018) Molecular Operating Environment (MOE), 2018.0802; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017.
- Chen, X.-t., Pitis, P., Liu, G., Yuan, C., Gotchev, D., Cowan, C. L., Rominger, D. H., Koblisch, M., Dewire, S. M., Crombie, A. L., Violin, J. D., et Yamashita, D. S. (2013) Structure-activity relationships and discovery of a G protein biased mu opioid receptor ligand, [(3-methoxythiophen-2-yl)methyl]({2-[(9R)-9-(pyridin-2-yl)-6-oxaspiro-[4.5]decan-9-yl]ethyl})amine (TRV130), for the treatment of acute severe pain. *J. Med. Chem.*, 56(20) : 8019–31.
- Cheng, Y.-C. et Prusoff, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, 22(23) : 3099–3108.
- Clineschmidt, B. V. et McGuffin, J. C. (1977) Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur. J. Pharmacol.*, 46(4) : 395–6.
- Clineschmidt, B. V., McGuffin, J. C., et Bunting, P. B. (1979) Neurotensin : Antinocisponsive action in rodents. *Eur. J. Pharmacol.*, 54(1-2) : 129–139.
- Coderre, T. J. (1993) The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol. Neurobiol.*, 7(3-4) : 229–246.
- Congreve, M., Langmead, C. J., Mason, J. S., et Marshall, F. H. (2011) Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors. *J. Med. Chem.*, 54(13) : 4283–311.
- Corbeil, C. R., Williams, C. I., et Labute, P. (2012) Variability in docking success rates due to dataset preparation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 26(6) : 775–786.
- Decosterd, I. et Woolf, C. J. (2000) Spared nerve injury : an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 87(2) : 149–58.

- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., et Shenoy, S. K. (2007) β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.*, 69(1) : 483–510.
- Dobner, P. R. (2005) Multitasking with neurotensin in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62(17) : 1946–63.
- Dobner, P. R. (2006) Neurotensin and pain modulation. *Peptides*, 27(10) : 2405–14.
- Dobner, P. R., Barber, D. L., Villa-Komaroff, L., et McKiernan, C. (1987) Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84(10) : 3516–3520.
- Driggers, E. M., Hale, S. P., Lee, J., et Terrett, N. K. (2008) The exploration of macrocycles for drug discovery—an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7(7) : 608–24.
- Dror, R. O., Green, H. F., Valant, C., Borhani, D. W., Valcourt, J. R., Pan, A. C., Arlow, D. H., Canals, M., Lane, J. R., Rahmani, R., Baell, J. B., Sexton, P. M., Christopoulos, A., et Shaw, D. E. (2013) Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs. *Nature*.
- Dubuc, I., Sarret, P., Labbé-Jullié, C., Botto, J. M., Honoré, E., Bourdel, E., Martinez, J., Costentin, J., Vincent, J. P., Kitabgi, P., et Mazella, J. (1999) Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J. Neurosci.*, 19 : 503–510.
- Dubuisson, D. et Dennis, S. G. (1977) The formalin test : A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(C) : 161–174.
- Egloff, P., Hillenbrand, M., Klenk, C., Batyuk, A., Heine, P., Balada, S., Schlinkmann, K. M., Scott, D. J., Schütz, M., et Plückthun, A. (2014) Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(6) : E655–62.
- Einsiedel, J., Held, C., Hervet, M., Plomer, M., Tschammer, N., Hübner, H., et Gmeiner, P. (2011) Discovery of highly potent and neurotensin receptor 2 selective neurotensin mimetics. *J. Med. Chem.*, 54(8) : 2915–23.
- Einsiedel, J., Hübner, H., Hervet, M., Härterich, S., Koschätzky, S., et Gmeiner, P. (2008) Peptide backbone modifications on the C-terminal hexapeptide of neurotensin. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 18(6) : 2013–2018.
- Elaridi, J., Patel, J., Jackson, W. R., et Robinson, A. J. (2006) Controlled synthesis of (S,S)-2,7-diaminosuberic acid : a method for regioselective construction of dicarba analogues of multicystine-containing peptides. *J. Org. Chem.*, 71(20) : 7538–45.
- Exton, J. H. (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36 : 481–509.

- Fanelli, R., Besserer-Offroy, É., René, A., Côté, J., Tétreault, P., Colletette-Tremblay, J., Longpré, J.-M., Leduc, R., Martinez, J., Sarret, P., et Cavelier, F. (2015) Synthesis and Characterization in Vitro and in Vivo of (1)-(Trimethylsilyl)alanine Containing Neurotensin Analogues. *J. Med. Chem.*, 58(19) : 7785–95.
- Fanelli, R., Floquet, N., Besserer-Offroy, É., Delort, B., Vivancos, M., Longpré, J.-M., Renault, P., Martinez, J., Sarret, P., et Cavelier, F. (2017) Use of Molecular Modeling to Design Selective NTS2 Neurotensin Analogues. *J. Med. Chem.*, 60(8) : 3303–3313.
- Feifel, D., Melendez, G., et Shilling, P. D. (2003) A systemically administered neurotensin agonist blocks disruption of prepulse inhibition produced by aserotonin-2A agonist. *Neuropsychopharmacology*, 28(4) : 651–653.
- Feifel, D., Reza, T. L., Wustrow, D. J., et Davis, M. D. (1999) Novel antipsychotic-like effects on prepulse inhibition of startle produced by a neurotensin agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288(2) : 710–713.
- Filmore, D. (2004) It's a GPCR world. *J. Mod. Drug Discov.*, 7(11) : 24–27.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., et Schiöth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, 63(6) : 1256–72.
- Gause, G. et Brazhnikova, M. (1944) Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds. *Nature*, 154 : 703–703.
- Gavenonis, J., Sheneman, B. a., Siegert, T. R., Eshelman, M. R., et Kritzer, J. a. (2014) Comprehensive analysis of loops at protein-protein interfaces for macrocycle design. *Nat. Chem. Biol.*, 10(july).
- Gendron, L., Perron, A., Payet, M. D., Gallo-Payet, N., Sarret, P., et Beaudet, A. (2004) Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling : internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol. Pharmacol.*, 66(6) : 1421–30.
- Gether, U. (1998) G Protein-coupled Receptors. II. MECHANISM OF AGONIST ACTIVATION. *J. Biol. Chem.*, 273(29) : 17979–17982.
- Giordanetto, F. et Kihlberg, J. (2014) Macrocyclic drugs and clinical candidates : what can medicinal chemists learn from their properties ? *J. Med. Chem.*, 57(2) : 278–95.
- Glas, A., Wamhoff, E.-C., Krüger, D. M., Rademacher, C., et Grossmann, T. N. (2017) Increased Conformational Flexibility of a Macrocycle-Receptor Complex Contributes to Reduced Dissociation Rates. *Chemistry*, 23(64) : 16157–16161.
- Grubbs, R. H. (2007) Olefin-metathesis catalysts for the preparation of molecules and materials (Nobel Lecture 2005). *Adv. Synth. Catal.*, 349(1-2) : 34–40.

- Gully, D., Canton, M., Boigegrain, R., Jeanjean, F., Molimard, J. C., Poncelet, M., Guedet, C., Heaulme, M., Leyris, R., et Brouard, A. (1993) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(1) : 65–9.
- Gully, D., Labeeuw, B., Boigegrain, R., Oury-Donat, F., Bachy, a., Poncelet, M., Steinberg, R., Suaud-Chagny, M. F., Santucci, V., Vita, N., Pecceu, F., Labbé-Jullié, C., Kitabgi, P., Soubrié, P., Le Fur, G., et Maffrand, J. P. (1997) Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280(2) : 802–12.
- Gurevich, V. et Gurevich, E. (2017) Molecular Mechanisms of GPCR Signaling : A Structural Perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(12) : 2519.
- Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B., et Bouvier, M. (2006) Monitoring Protein-Protein Interactions in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). In *Curr. Protoc. Neurosci.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Hamm, H. E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.*, 273(2) : 669–72.
- Härterich, S., Koschätzky, S., Einsiedel, J., et Gmeiner, P. (2008) Novel insights into GPCR-peptide interactions : mutations in extracellular loop 1, ligand backbone methylations and molecular modeling of neurotensin receptor 1. *Bioorganic {&} Med. Chem.*, 16(20) : 9359–9368.
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., et Gloriam, D. E. (2017) Trends in GPCR drug discovery : new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 16(12) : 829–842.
- Heyl, D. L., Seidler, a. M., He, J. X., Sawyer, T. K., Wustrow, D. J., Akunne, H. C., Davis, M. D., Pugsley, T. a., Heffner, T. G., et Corbin, a. E. (1994) Structure-activity and conformational studies of a series of modified C-terminal hexapeptide neurotensin analogues. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 44(3) : 233–8.
- Hole, K. et Tjølsen, A. (1993) The tail-flick and formalin tests in rodents : changes in skin temperature as a confounding factor. *Pain*, 53(3) : 247–254.
- Hoveyda, A. H. et Zhugralin, A. R. (2007) The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction. *Nature*, 450(7167) : 243–51.
- Hulme, E. C. et Trevethick, M. A. (2010) Ligand binding assays at equilibrium : Validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.*, 161(6) : 1219–1237.
- Isberg, V., De Graaf, C., Bortolato, A., Cherezov, V., Katritch, V., Marshall, F. H., Mordalski, S., Pin, J. P., Stevens, R. C., Vriend, G., et Gloriam, D. E. (2015) Generic GPCR residue numbers - Aligning topology maps while minding the gaps. *Trends Pharmacol. Sci.*, 36(1) : 22–31.

- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J. R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S. S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., Petersen, C. M., Lewin, G. R., Hempstead, B. L., Willnow, T. E., et Nykjaer, A. (2007) Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.*, 10(11) : 1449–1457.
- Kaczyńska, K. et Szereda-Przestaszewska, M. (2012) Cardio-respiratory effects of systemic neurotensin injection are mediated through activation of neurotensin NTS1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 691(1-3) : 245–50.
- Katia, B. (2015) Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward : Insights from knockout studies. *Front. Pharmacol.*, 6(February) : 6.
- Katritch, V., Cherezov, V., et Stevens, R. C. (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53(October 2012) : 531–56.
- Kenakin, T. (2004) Principles : receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25(4) : 186–92.
- Kenakin, T. (2017) Theoretical aspects of GPCR ?ligand complex pharmacology. *Chem. Rev.*, 117(1) : 4–20.
- Kenakin, T. et Christopoulos, A. (2012) Signalling bias in new drug discovery : detection, quantification and therapeutic impact. *Nat. Rev. Drug Discov.*, (February).
- Kenakin, T. et Christopoulos, A. (2013a) Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12(6) : 483.
- Kenakin, T. et Christopoulos, A. (2013b) Signalling bias in new drug discovery : detection, quantification and therapeutic impact. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12(3) : 205–16.
- Kenakin, T., Watson, C., Muniz-Medina, V., Christopoulos, A., et Novick, S. (2012) A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem. Neurosci.*, 3(3) : 193–203.
- Kennedy, J. D. (2007) Neuropathic pain : Molecular complexity underlies continuing unmet medical need. *J. Med. Chem.*, 50(11) : 2547–2556.
- King, M. et Wagner, A. (2014) Developments in the field of bioorthogonal bond forming reactions-past and present trends. *Bioconjug. Chem.*, 25(5) : 825–39.
- Kitabgi, P. (1982) Effects of neurotensin on intestinal smooth muscle : application to the study of structure-activity relationships. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 400 : 37–55.
- Kitabgi, P., Poustis, C., Granier, C., Van Rietschoten, J., Rivier, J., Morgat, J. L., et Freychet, P. (1980) Neurotensin binding to extraneural and neural receptors : comparison with biological activity and structure–activity relationships. *Mol. Pharmacol.*, 18(1) : 11–9.

- Klarskov, K., Gagnon, H., Boudreault, P. L., Normandin, C., Plancq, B., Marsault, E., Gleich, G. J., et Naylor, S. (2018) Structure determination of disease associated peak AAA from L-Tryptophan implicated in the eosinophilia-myalgia syndrome. *Toxicol. Lett.*, 282(June 2017) : 71–80.
- Krumm, B. E. et Grisshammer, R. (2015) Peptide ligand recognition by G protein-coupled receptors. *Front. Pharmacol.*, 6(March) : 1–6.
- Krumm, B. E., Lee, S., Bhattacharya, S., Botos, I., White, C. F., Du, H., Vaidehi, N., et Grisshammer, R. (2016) Structure and dynamics of a constitutively active neurotensin receptor. *Sci. Rep.*, 6 : 38564.
- Labbé-Jullié, C., Botto, J. M., Mas, M. V., Chabry, J., Mazella, J., Vincent, J. P., Gully, D., Maffrand, J. P., et Kitabgi, P. (1995) [3H]SR 48692, the first nonpeptide neurotensin antagonist radioligand : characterization of binding properties and evidence for distinct agonist and antagonist binding domains on the rat neurotensin receptor. *Mol. Pharmacol.*, 47(5) : 1050–6.
- Lagerström, M. C. et Schiöth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7(4) : 339–57.
- Lazarus, L. H., Perrin, M. H., et Brown, M. R. (1977) Mast cell binding of neurotensin. I. Iodination of neurotensin and characterization of the interaction of neurotensin with mast cell receptor sites. *J. Biol. Chem.*, 252(20) : 7174–9.
- Le Bars, D., Gozariu, M., et Cadden, S. W. (2001) [Acute pain measurement in animals. Part 1]. *Ann. Fr. d'anesthésie réanimation*, 20(4) : 347–65.
- Lee, S., Bhattacharya, S., Tate, C. G., Grisshammer, R., et Vaidehi, N. (2015) Structural Dynamics and Thermostabilization of Neurotensin Receptor 1. *J. Phys. Chem. B*, 119(15) : 4917–4928.
- Lefkowitz, R. J. (2004) Historical review : a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25(8) : 413–22.
- Lefkowitz, R. J. (2013) A Brief History of G-Protein Coupled Receptors (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.*, pages n/a–n/a.
- Lundquist, J. T. et Dix, T. A. (1999) Preparation and receptor binding affinities of cyclic C-terminal neurotensin (8-13) and (9-13) analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9(17) : 2579–82.
- Luttrell, L. M. et Lefkowitz, R. J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.*, 115(Pt 3) : 455–65.
- Madsen, C. M. et Clausen, M. H. (2011) Biologically Active Macrocyclic Compounds - from Natural Products to Diversity-Oriented Synthesis. *European J. Org. Chem.*, 2011(17) : 3107–3115.

- Mallinson, J. et Collins, I. (2012) Macrocycles in new drug discovery. *Future Med. Chem.*, 4(11) : 1409–38.
- Manglik, A., Lin, H., Aryal, D. K., McCorvy, J. D., Dengler, D., Corder, G., Levit, A., Kling, R. C., Bernat, V., Hübner, H., Huang, X.-P., Sassano, M. F., Giguère, P. M., Löber, S., Da Duan, Scherrer, G., Kobilka, B. K., Gmeiner, P., Roth, B. L., et Shoichet, B. K. (2016) Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*, 537(7619) : 1–6.
- Marsault, E., Hoveyda, H. R., Peterson, M. L., Saint-Louis, C., Landry, A., Vézina, M., Ouellet, L., Wang, Z., Ramaseshan, M., Beaubien, S., Benakli, K., Beauchemin, S., Déziel, R., Peeters, T., et Fraser, G. L. (2006) Discovery of a new class of macrocyclic antagonists to the human motilin receptor. *J. Med. Chem.*, 49(24) : 7190–7.
- Marsault, E. et Peterson, M. L. (2011) Macrocycles are great cycles : applications, opportunities, and challenges of synthetic macrocycles in drug discovery. *J. Med. Chem.*, 54(7) : 1961–2004.
- Marsault, É. et Peterson, M. L. (2017) *Practical Medicinal Chemistry with Macrocycles : Design, Synthesis, and Case Studies*. Wiley, Hoboken, NJ, USA, wiley edition.
- Marullo, S. et Bouvier, M. (2007) Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28(8) : 362–5.
- May, L. T., Leach, K., Sexton, P. M., et Christopoulos, A. (2007) Allosteric Modulation of G Protein–Coupled Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47(1) : 1–51.
- Mazella, J., Botto, J. M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., et Vincent, J. P. (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci.*, 16(18) : 5613–20.
- Mazella, J. et Vincent, J.-P. (2006a) Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides*, 27(10) : 2469–75.
- Mazella, J. et Vincent, J.-P. (2006b) Internalization and recycling properties of neurotensin receptors. *Peptides*, 27(10) : 2488–92.
- Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J. P., et Vincent, J. P. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.*, 273 : 26273–26276.
- McKinney, M. et Raddatz, R. (2006) Practical Aspects of Radioligand Binding. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, 33(1) : 1.3.1–1.3.42.
- Mustain, W. C., Rychahou, P. G., et Evers, B. M. (2011) The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 18(1) : 75–82.

- Navarro, V., Martin, S., Sarret, P., Nielsen, M. S., Petersen, C. M., Vincent, J., et Mazella, J. (2001) Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett.*, 495(1-2) : 100–5.
- Nemeroff, C. B., Bissette, G., Prange, A. J., Loosen, P. T., Barlow, T. S., et Lipton, M. A. (1977) Neurotensin : central nervous system effects of a hypothalamic peptide. *Brain Res.*, 128(3) : 485–96.
- Nemeroff, C. B., Osbahr, A. J., Manberg, P. J., Ervin, G. N., et Prange, A. J. (1979) Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76(10) : 5368–71.
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., et Christopoulos, A. (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. *Pharmacol. Rev.*, 55(4) : 597–606.
- Nguyen, G. K. T., Wang, S., Qiu, Y., Hemu, X., Lian, Y., et Tam, J. P. (2014) Butelase 1 is an Asx-specific ligase enabling peptide macrocyclization and synthesis. *Nat. Chem. Biol.*, 10(July).
- Nielsen, D. S., Shepherd, N. E., Xu, W., Lucke, A. J., Stoermer, M. J., et Fairlie, D. P. (2017) Orally Absorbed Cyclic Peptides. *Chem. Rev.*, page acs.chemrev.6b00838.
- Nieto Gutierrez, A. et McDonald, P. H. (2017) GPCRs : Emerging anti-cancer drug targets. *Cell. Signal.*, (September) : 0–1.
- Oakley, R. H., Laporte, S. a., Holt, J. a., Caron, M. G., et Barak, L. S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.*, 275(22) : 17201–10.
- Offermanns, S. (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 83(2) : 101–130.
- Ovadia, O., Greenberg, S., Chatterjee, J., Laufer, B., Opperer, F., Kessler, H., Gilon, C., et Hoffman, A. (2011) The effect of multiple N-methylation on intestinal permeability of cyclic hexapeptides. *Mol. Pharm.*, 8(2) : 479–87.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., et Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5(12) : 993–6.
- Pándy-Szekeres, G., Munk, C., Tsonkov, T. M., Mordalski, S., Harpsøe, K., Hauser, A. S., Bojarski, A. J., et Gloriam, D. E. (2018) GPCRdb in 2018 : Adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res.*, 46(D1) : D440–D446.
- Patrycja, P. K. et Lipkowski, A. W. (2013) Neurotensin and neurotensin receptors : characteristic, structure-activity relationship and pain modulation -A review. *Eur. J. Pharmacol.*, pages 1–7.

- Pelaprat, D. (2006) Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides*, 27(10) : 2476–87.
- Pérez de Vega, M. J., García-Aranda, M. I., et González-Muñiz, R. (2010) A role for ring-closing metathesis in medicinal chemistry : Mimicking secondary architectures in bioactive peptides. *Med. Res. Rev.*, 31(5) : 677–715.
- Petersen, C. M., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S. K., et Madsen, P. (1999) Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.*, 18(3) : 595–604.
- Petrie, K. A., Bubser, M., Casey, C. D., Davis, M. D., Roth, B. L., et Deutch, A. Y. (2004) The neurotensin agonist PD149163 increases fos expression in the prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology*, 29(10) : 1878–1888.
- Queval, P., Jahier, C., Baslé, O., et Mauduit, M. (2013) Cationic Ruthenium Complexes in Olefin Metathesis. *Curr. Org. Chem.*, 17(22) : 2560–2574.
- Quistgaard, E. M., Madsen, P., Grøftehauge, M. K., Nissen, P., Petersen, C. M., et Thirup, S. S. (2009) Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16(1) : 96–8.
- Rajagopal, S. (2013) Quantifying biased agonism : understanding the links between affinity and efficacy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12(6) : 483.
- Rand, A. C., Leung, S. S. F., Eng, H., Rotter, C. J., Sharma, R., Kalgutkar, A. S., Zhang, Y., Varma, M. V., Farley, K. A., Khunte, B., Limberakis, C., Price, D. A., Liras, S., Mathiowetz, A. M., Jacobson, M. P., et Lokey, R. S. (2012) Optimizing PK properties of cyclic peptides : the effect of side chain substitutions on permeability and clearance. *Medchemcomm*, 3(10) : 1282–1289.
- Regard, J. B., Sato, I. T., et Coughlin, S. R. (2008) Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*, 135(3) : 561–71.
- Rezai, T., Bock, J. E., Zhou, M. V., Kalyanaraman, C., Lokey, R. S., et Jacobson, M. P. (2006a) Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability : successful in silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(43) : 14073–80.
- Rezai, T., Yu, B., Millhauser, G. L., Jacobson, M. P., et Lokey, R. S. (2006b) Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(8) : 2510–1.
- Richard, F., Barroso, S., Martinez, J., Labbé-Jullié, C., et Kitabgi, P. (2001) Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol. Pharmacol.*, 60(6) : 1392–8.
- Rioux, F., Lemieux, M., et Roy, G. (1989) Capsaicin-sensitive primary afferents are involved in the hypotensive effect of neurotensin in ganglion-blocked guinea pigs. *Peptides*, 10(5) : 1033–1040.

- Rioux, F., Quirion, R., St-Pierre, S., Regoli, D., Jolicoeur, F. B., Bélanger, F., et Barbeau, A. (1981) The hypotensive effect of centrally administered neurotensin in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 69(3) : 241–7.
- Rominger, D. H., Cowan, C. L., Gowen-MacDonald, W., et Violin, J. D. (2014) Biased ligands : pathway validation for novel GPCR therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 16C(Figure 1) : 108–115.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., et Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245) : 356–63.
- Roussy, G., Dansereau, M.-A., Baudisson, S., Ezzoubaa, F., Belleville, K., Beaudet, N., Martinez, J., Richelson, E., et Sarret, P. (2009) Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity. *Mol. Pain*, 5 : 38–52.
- Ruiz-Gómez, G., Tyndall, J. D. a., Pfeiffer, B., Abbenante, G., et Fairlie, D. P. (2010) Update 1 of : Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chem. Rev.*, 110(4) : PR1–41.
- Sarret, P., Esdaile, M. J., Perron, A., Martinez, J., Stroh, T., et Beaudet, A. (2005) Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J. Neurosci.*, 25(36) : 8188–96.
- Sato, J., Makita, N., et Iiri, T. (2016) Inverse agonism : the classic concept of GPCRs revisited [Review]. *Endocr. J.*, 63(6) : 507–514.
- Schaab, C., Kling, R. C., Einsiedel, J., Hübner, H., Clark, T., Seebach, D., et Gmeiner, P. (2014) Structure-based evolution of subtype-selective neurotensin receptor ligands. *ChemistryOpen*, 3(5) : 206–18.
- Schaeffer, P., Laplace, M. C., Prabonnaud, V., Bernat, A., Gully, D., Lespy, L., et Herbert, J. M. (1997) Neurotensin induces the release of prostacyclin from human umbilical vein endothelial cells in vitro and increases plasma prostacyclin levels in the rat. *Eur J Pharmacol*, 323(2-3) : 215–221.
- Sefler, a. M., He, J. X., Sawyer, T. K., Holub, K. E., Omecinsky, D. O., Reily, M. D., Thanabal, V., Akunne, H. C., et Cody, W. L. (1995) Design and structure-activity relationships of C-terminal cyclic neurotensin fragment analogues. *J. Med. Chem.*, 38(2) : 249–57.
- Simeth, N. A., Bause, M., Dobmeier, M., Kling, R. C., Lachmann, D., Hübner, H., Einsiedel, J., Gmeiner, P., et König, B. (2016) NTS2-selective neurotensin mimetics with tetrahydrofuran amino acids. *Bioorg. Med. Chem.*, pages 1–10.
- Simonato, M. (1996) The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17(11) : 410–5.
- Smith, K. E., Boules, M., Williams, K., et Richelson, E. (2012) NTS1 and NTS2 mediate analgesia following neurotensin analog treatment in a mouse model for visceral pain. *Behav. Brain Res.*, 232(1) : 93–97.

- Smith, N. J. et Milligan, G. (2010) Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers : uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol. Rev.*, 62(4) : 701–25.
- St-Gelais, F., Jomphe, C., et Trudeau, L.-E. (2006) The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology : what is the evidence ? *J. Psychiatry Neurosci.*, 31(4) : 229–45.
- Stevens, R. C., Cherezov, V., Katritch, V., Abagyan, R., Kuhn, P., Rosen, H., et Wüthrich, K. (2013) The GPCR Network : A large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., et Gilman, a. G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36 : 461–480.
- Tétreault, P., Beaudet, N., Perron, A., Belleville, K., René, A., Cavelier, F., Martinez, J., Stroh, T., Jacobi, A. M., Rose, S. D., Behlke, M. A., et Sarret, P. (2013) Spinal NTS2 receptor activation reverses signs of neuropathic pain. *FASEB J.*, 27(9) : 3741–52.
- Thomas, J. B., Giddings, A. M., Olepu, S., Wiethe, R. W., Harris, D. L., Narayanan, S., Warner, K. R., Sarret, P., Longpre, J.-M., Runyon, S. P., et Gilmour, B. P. (2015) Identification of N-{[6-chloro-4-(2,6-dimethoxyphenyl)quinazolin-2-yl]carbonyl}-l-leucine (NTRC-808), a novel nonpeptide chemotype selective for the neurotensin receptor type 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25(2) : 292–6.
- Thomas, J. B., Giddings, A. M., Wiethe, R. W., Olepu, S., Warner, K. R., Sarret, P., Gendron, L., Longpre, J.-M., Zhang, Y., Runyon, S. P., et Gilmour, B. P. (2014) Identification of 1-([1-(4-Fluorophenyl)-5-(2-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]carbonyl)amino)cyclohexane Carboxylic Acid as a Selective Non-peptide Neurotensin Receptor Type 2 Compound. *J. Med. Chem.*
- Thomas, J. B., Vivancos, M., Giddings, A. M., Wiethe, R. W., Warner, K. R., Murza, A., Besserer-Offroy, É., Longpre, J.-M., Runyon, S. P., Decker, A. M., Gilmour, B. P., et Sarret, P. (2016) Identification of 2-([1-(4-fluorophenyl)-5-(2-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]carbonyl)amino)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-2-carboxylic acid (NTRC-844) as a selective antagonist for the Rat Neurotensin receptor type 2. *ACS Chem. Neurosci.*, page acschemneuro.6b00097.
- Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., et Hole, K. (1992) The formalin test : an evaluation of the method. *Pain*, 51(1) : 5–17.
- Trang, T., Al-Hasani, R., Salvemini, D., Salter, M. W., Gutstein, H., et Cahill, C. M. (2015) Pain and Poppies : The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *J. Neurosci.*, 35(41) : 13879–13888.
- Tyler, B. M., Douglas, C. L., Fauq, a., Pang, Y. P., Stewart, J. a., Cusack, B., McCormick, D. J., et Richelson, E. (1999) In vitro binding and CNS effects of novel neurotensin agonists that cross the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*, 38(7) : 1027–34.

- Tyler-McMahon, B. M., Boules, M., et Richelson, E. (2000) Neurotensin : Peptide for the next millennium. *Regul. Pept.*, 93(1-3) : 125–136.
- Tyler-McMahon, B. M., Stewart, J. A., Farinas, F., McCormick, D. J., et Richelson, E. (2000) Highly potent neurotensin analog that causes hypothermia and antinociception. *Eur. J. Pharmacol.*, 390(1-2) : 107–111.
- Tyndall, J. D. a., Pfeiffer, B., Abbenante, G., et Fairlie, D. P. (2005) Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chem. Rev.*, 105(3) : 793–826.
- Uddin, R., Simms, J., et Poyner, D. (2018) Functional characterisation of G protein-coupled receptors. *Methods*.
- Udugamasooriya, D. G. et Spaller, M. R. (2008) Conformational constraint in protein ligand design and the inconsistency of binding entropy. *Biopolymers*, 89(8) : 653–667.
- van den Berg, W. B., Joosten, L. A. B., et van Lent, P. L. E. M. (2007) Murine antigen-induced arthritis. *Methods Mol. Med.*, 136 : 243–53.
- van der Westhuizen, E. T., Breton, B., Christopoulos, A., et Bouvier, M. (2014) Quantification of ligand bias for clinically relevant beta2-adrenergic receptor ligands : implications for drug taxonomy. *Mol. Pharmacol.*, 85(3) : 492–509.
- Van Kemmel, F. M., Dubuc, I., Bourdel, E., Fehrentz, J. a., Martinez, J., et Costentin, J. (1996) A C-terminal cyclic 8-13 neurotensin fragment analog appears less exposed to neprilysin when it crosses the blood-brain barrier than the cerebrospinal fluid-brain barrier in mice. *Neurosci. Lett.*, 217(1) : 58–60.
- Villar, E. a., Beglov, D., Chennamadhavuni, S., Porco, J. a., Kozakov, D., Vajda, S., et Whitty, A. (2014) How proteins bind macrocycles. *Nat. Chem. Biol.*, 10(july).
- Vincent, J. P., Mazella, J., et Kitabgi, P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20(7) : 302–9.
- Violin, J. D., Crombie, A. L., Soergel, D. G., et Lark, M. W. (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors : promise and progress. *Trends Pharmacol. Sci.*, 35(7) : 308–16.
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Dumont, X., Kaghad, M., Gully, D., Le Fur, G., Ferrara, P., et Caput, D. (1993) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett.*, 317(1-2) : 139–42.
- Wang, C. K. et Craik, D. J. (2016) Cyclic peptide oral bioavailability : Lessons from the past. *Biopolymers*, 106(6) : 901–909.
- Wang, D., Tan, Y. C., Kreitzer, G. E., Nakai, Y., Shan, D., Zheng, Y., et Huang, X. Y. (2006) G proteins G12 and G13 control the dynamic turnover of growth factor-induced dorsal ruffles. *J. Biol. Chem.*, 281(43) : 32660–32667.

- White, C. J. et Yudin, A. K. (2011) Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat. Chem.*, 3(7) : 509–24.
- White, J. F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Shah, P., Shiloach, J., Tate, C. G., et Grisshammer, R. (2012a) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*, 490(7421) : 508–13.
- White, J. F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Shah, P., Shiloach, J., Tate, C. G., et Grisshammer, R. (2012b) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*, 490(7421) : 508–13.
- White, T. R., Renzelman, C. M., Rand, A. C., Rezai, T., McEwen, C. M., Gelev, V. M., Turner, R. a., Linington, R. G., Leung, S. S. F., Kalgutkar, A. S., Bauman, J. N., Zhang, Y., Liras, S., Price, D. a., Mathiowetz, A. M., Jacobson, M. P., et Lokey, R. S. (2011) On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds. *Nat. Chem. Biol.*, 7(11) : 810–7.
- Wustrow, D., Davis, M., Akunne, H., Corbin, A., Wiley, J., Wise, L., et Heffner, T. (1995) Reduced amide bond neurotensin 8–13 mimetics with potent in vivo activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5(9) : 997–1002.